Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Die Triterpene der Betula pendula ROTH und Betula pubescens EHRH.

Eine vergleichende Untersuchung der Rinden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Kuhn
aus Berlin

1966

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Die Triterpene der Betula pendula ROTH und Betula pubescens EHRH.

Eine vergleichende Untersuchung der Rinden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Kuhn
aus Berlin

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Referent: Professor Dr. R. Hänsel

Koreferent: Professor Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 1966

Tag der Promotion: 20. OKT. 1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0046

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Die Arbeit entstand auf Anregung des Direktors dieses Instituts, meines verehrten Lehrers, Herrn Professor Dr. R. Hänsel, dem ich für die Überlassung des Themas, die Förderung meiner wissenschaftlichen Weiterbildung, für wertvolle Ratschläge und das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, herzlich danke.

Herrn Dr. H. Rimpler, wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin, bin ich für die zahlreichen klärenden Gespräche und Hinweise im Zusammenhang mit meiner Arbeit zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt vor allem auch:

Herrn Dr. C. Leuckert, wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität, für die Diskussion botanischer Probleme meiner Arbeit,

Herrn Dr. Sukopp, Institut für angewandte Botanik der Technischen Universität Berlin, für die Hilfe bei der Beschaffung und Bestimmung des Pflanzenmaterials,

meinen Mitarbeitern am Institut für Pharmakognosie, die sich stets um die Erfüllung meiner Wünsche bemühten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, danke ich für die Förderung der vorliegenden Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung und Problemstellung	8
II	Botanik der untersuchten Betula-Arten ..	10
III	Bisherige Untersuchungen über das Vorkommen von Triterpenen in den Rinden von Betula pendula ROTH und Betula pubescens EHRH.	13
IV	Biogenese und Endausgestaltung von Triterpenen	15
	Eigene Untersuchungen	28
V	Hauptteil	29
A)	Untersuchung der Triterpenführung der Rinde von Betula pendula	29
1.	Qualitativer Nachweis der Triterpene ...	29
2.	Isolierung der Triterpene	30
3.	Identifizierung der isolierten Verbindungen	33
	a) Verbindung c (Betulonaldehyd)	35
	b) Verbindung d (Lupeol)	37
	c) Verbindung e_1 (Betulinaldehyd)	39
	d) Verbindung e_2 (ß-Sitosterin)	42
	e) Verbindung B (Betulin)	44
	f) Verbindung f (Acetyloleanolsäure) ...	46
	g) Verbindung g_2 (Betulinsäure)	48
	h) Substanz H (Oleanolsäure,Ursolsäure)	51
B)	Untersuchung der Triterpenführung der Rinde von Betula pubescens	55
1.	Qualitativer Nachweis der Triterpene ...	55
2.	Isolierung der Triterpene	57

3. Identifizierung der isolierten Verbindungen ..... Seite 58

a) Verbindung c_{pub} (Betulonaldehyd) .. 58

b) Verbindung d_{pub} (Lupeol) 59

c) Verbindung $e_{1\ pub}$ (Betulinaldehyd) 60

d) Verbindung $e_{2\ pub}$ (ß-Sitosterin) .. 60

e) Verbindung B_{pub} (Betulin) 61

f) Verbindung f_{pub} (Acetyloleanolsäure) 61

g) Verbindung $g_{2\ pub}$ (Betulinsäure) .. 62

h) Substanz H_{pub} (Oleanolsäure, Ursolsäure) 62

VI Diskussion 64

VII Zusammenfassung 68

VIII Experimenteller Teil 69

Allgemeines 70

A) Qualitativer Nachweis der Triterpene der Rinde von Betula pendula (Betula pubescens) 71

B) Isolierung der Verbindungen von Betula pendula (Betula pubescens) 71

1. Extraktion 71

2. Präparative Trennung der Triterpene ... 71

2.1 Trennung der Triterpene, $Rf \geq Rf_{Betulin}$ an Säule I 71

2.2 Trennung der Triterpene, $Rf \leq Rf_{Betulin}$ an Säule II 72

C) Identifizierung der isolierten Verbindungen 73

1. Verbindung c 73

2. Verbindung c_{pub} 74

3. Verbindung d 75

4. Verbindung d_{pub} 77

Seite

5. Verbindung e_1 77

6. Verbindung $e_{1\ pub}$ 79

7. Verbindung e_2 79

8. Verbindung $e_{2\ pub}$ 80

9. Verbindung B 81

10. Verbindung B_{pub} 82

11. Verbindung f 82

12. Verbindung f_{pub} 84

13. Verbindung g_2 85

14. Verbindung $g_{2\ pub}$ 86

15. Substanz H 86

16. Substanz H_{pub} 87

D) Prüfung auf Allobetulin und zwei von HEJNO, JAROLÍM und ŠORM nicht näher charakterisierte Acetyllactone 87

1. Betula pendula 87

2. Betula pubescens 88

IX Literaturverzeichnis 89

X Lebenslauf 93

I Einleitung und Problemstellung

Sämtliche grünen Pflanzen zeichnen sich durch eine gemeinsame Eigenschaft aus: sie bilden aus der Kohlensäure der Luft organische Materie. Einem für alle grünen Pflanzen gleichen Grundstoffwechsel steht dabei die große Mannigfaltigkeit des Sekundärstoffwechsels gegenüber. Die Verschiedenartigkeit der Produkte dieses Sekundärstoffwechsels erlaubt es mitunter, das Vorkommen solcher sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe neben morphologischen, anatomischen und cytologischen Merkmalen als zusätzliches phytochemisches Merkmal taxonomisch zu bewerten.

Die folgende Untersuchung ist eine phytochemische, vergleichende Untersuchung. Homologe Organe zweier verwandter Pflanzen werden auf charakteristische Unterschiede oder Ähnlichkeiten phytochemischer Merkmale geprüft. Untersuchungsobjekte sind die freien Triterpene der Rinden der beiden zu den Betulaceen gehörenden Arten Betula pendula ROTH und Betula pubescens EHRH. .

Zeigen sich Unterschiede in der Triterpenführung der beiden Arten, könnten die Ergebnisse zur Klärung folgender Frage beitragen:
Betula carpatica WALDST. et KIT., eine arktisch-alpine Birkenart, wird von NATHO (27) als introgressiver Bastard zwischen Betula pubescens und Betula pendula aufgefaßt. NATHO kommt durch eingehende, hauptsächlich morphologische und anatomische Studien zu dieser Auffassung, da Betula carpatica zwar überwiegend Merkmale von Betula pubescens, daneben aber auch typische Merkmale von Betula pendula aufweist. JOHNSSON (20) nimmt dagegen auf Grund genetischer Untersuchungen an, daß Betula pendula und Betula pubescens keine Bastarde bilden. Er erklärt die intermediären Formen aus einer großen Variationsbreite von Betula pubescens bzw. Betula pendula. Betula carpatica wäre demnach als eine Form von Betula pubescens aufzufassen, die innerhalb deren Variationsbreite möglich ist. (Vergleiche auch

HEGI (16), der Betula carpatica als Betula pubescens EHRH. var. carpatica (WALDST. et KIT.) KOCH anführt).

Falls die Triterpenführung in den beiden Arten variiert, müßte Betula carpatica in die Untersuchung einbezogen werden. Es sollte sich dann zeigen, ob die Triterpene von Betula carpatica mit denen von Betula pubescens identisch sind, oder ob sich auch für Betula pendula charakteristische Triterpene bei Betula carpatica nachweisen lassen.

II Botanik der untersuchten Betula-Arten

Die Gattung Betula gehört zu der Familie der Betulaceae. Sie umfaßt nach Engler's "Syllabus der Pflanzenfamilie" (13) etwa 40 Arten, deren Hauptverbreitungsgebiet die gesamte nördliche Hemisphäre ist. ROTHMALER (30) führt 5 heimische Arten auf, wobei er neben Betula pendula, Betula pubescens, Betula humilis und Betula nana auch Betula carpatica als eigene Art zählt.

LINNÉ (24) faßte die beiden Baumbirken noch als eine Sippe, Betula alba L., auf. EHRHARDT (10) erkannte dann, daß darin 2 gute Arten enthalten sind; er teilte die Großart in Betula verrucosa und Betula pubescens auf. Betula verrucosa EHRH. besitzt jedoch als älteres Synonym Betula pendula ROTH, dem infolge der Prioritätsregel der Vorrang gebührt.

Im folgenden Teil werden die morphologischen, anatomischen und cytologischen Merkmale der untersuchten Betula-Arten gegenübergestellt (nach G. NATHO (27)) :

Betula pendula ist ein Baum (bis 25 m hoch) mit weißer bis weißgelblicher Rinde, die den Stamm und die Hauptverzweigungen bedeckt. Die Stammbasis trägt schwarze Borke, die bei älteren Exemplaren bis in die Krone reicht. Die Hauptäste sind stark aufstrebend; die Zweige hängen lang herab (Hängebirke) und haben eine rötlichbraune Rinde. Auf jungen Zweigen finden sich stets zahlreiche Harzwarzen, bei älteren grauweiße Harzbeläge. Sie sind unbehaart. Das Blatt (4 - 6 cm lang, 2 - 4 cm breit) ist rhombisch, mit langer Spitze. Die Außenlinie zur Blattspitze ist konkav bis (seltener) gerade. Die Seitenecken sind eckig bis leicht gerundet, der Blattrand ist doppelt gesägt. Die Zähnung beginnt entfernt von der Ansatzstelle des Blattstieles. Die Zahl der Seitennervenpaare beträgt 6 - 8. Ein Kontrast der Nerven mit der Lamina ist kaum vorhanden. Die Aderwinkel sind stets kahl, die Blattober- und -unterseite sind

höchstens mit vereinzelten Härchen besetzt. Im Blattquerschnitt treten ein bis mehrere Palisaden auf; die Epidermiszellen sind regelmäßig vieleckig und kleiner als die Schließzellen. Die Rhachis besitzt unterhalb des Leitbündels einen mehr oder weniger geschlossenen Halbkreis sklerenchymatischer Zellen. Der Blattstiel ist 2 - 3 cm lang und kahl. Die Knospen sind harzig. Die Knospenschuppen besitzen eine kurze und lockere Wimperung (die Tragblätter der männlichen Blüten ebenfalls). Die weiblichen Kätzchen hängen und sind über 2 cm lang. Die Mittellappen der wenig behaarten Fruchtschuppen sind dreieckig und gedrungen, die Seitenlappen sind breit und zurückgezogen. Die Schuppen sind am Rand kurz und locker gewimpert. Das Nüßchen ist oval gestreckt, die Flügel sind 2 - 3 mal so breit wie die Nüßchen und weit über die Narbenansätze vorgezogen; häufig überdecken sie sich. Die Früchte sind kahl oder nur spärlich unterhalb der Narbenansätze behaart.
Betula pendula besitzt die Chromosomenzahl 2n = 28.

Betula pubescens ist ein Baum (bis 20 m hoch) oder seltener ein Strauch. Seine Rinde ist gelblich, selten bräunlich. Die Borkenbildung setzt später als bei Betula pendula ein. Die Äste erster Ordnung sind stark ausladend, während die Zweige letzter Ordnung starr aufrecht stehen (Besenbirke). Die jungen Zweige sind behaart und drüsenlos. Das Blatt ist rundlich-gestreckt (3 - 5 cm lang, 1,5 - 3,5 cm breit), kurz zugespitzt, mit stets gerundeten Seitenecken. Die Außenlinie zur Blattspitze ist konvex. Die Zahl der Seitennervenpaare beträgt 6 - 8. Ihr Kontrast mit der Lamina auf der Blattunterseite ist sehr gut. Die Blattextur ist derb und glänzend. In den Aderwinkeln ist die Moorbirke stets bärtig. Die Blattober- und -unterseite sind mehr oder weniger behaart. Im Blattquerschnitt ist eine einfache Palisadenschicht erkennbar.

Die Epidermiszellen sind etwas größer als die Schließzellen. Der Querschnitt der Rhachis gleicht dem von Betula pendula. Die behaarten Blattstiele sind 1 - 2,5 cm lang. Die Knospen sind wenig harzig, ihre Schuppen sind am Rande dicht mit langen, braunen Wimpern besetzt. Die reifen, weiblichen Kätzchen hängen und sind meist über 2 cm lang. Der Mittellappen der Fruchtschuppe ist vorgezogen und wenig breit; die Seitenlappen sind trapezförmig, wenig vorgezogen oder seitlich abspreizend. Auf dem Rücken und am Rand sind die Schuppen stark behaart. Die Nüßchen sind rundlich, ihre Flügel überragen die Narbenansätze nicht. Im oberen Drittel sind die Nüßchen behaart und auch der Flügelrand ist seitlich der Narbenansätze gewimpert.
Betula pubescens besitzt die Chromosomenzahl 2n = 56.

Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der Gattung Betula ist, ob eine Bastardisierung der beiden untersuchten Arten Betula pendula und Betula pubescens vorkommt. Sie wird von verschiedenen Autoren verschieden beantwortet. JOHNSSON (20) z.B. verneint sie; auf Grund genetischer Untersuchungen an der Gattung Betula vertritt er die Meinung, daß zwischen Betula pendula und Betula pubescens eine Sterilitätsbarriere besteht. Natho (27) dagegen bejaht diese Frage in den Gebieten, in denen sich die Areale der beiden Arten überschneiden (die Nordgrenze von Betula pubescens liegt bei etwa 71° nördlicher Breite, die von Betula pendula schon bei etwa 65°. Im Süden findet man Betula pendula bis auf die Höhe von Sizilien, Betula pubescens nur bis zum Südfuß der Alpen). Nach ihm wird die große Variationsbreite, die von verschiedenen Autoren (JOHNSSON (20), LINDQUIST (23)) für Betula pendula und Betula pubescens beschrieben wird, durch introgressive Hybridisation vorgetäuscht. Unter introgressiver Hybridisation versteht er den Vorgang der wiederholten Rückkreuzung der Bastarde unter natürlichen Bedingungen mit den Eltern und die Kreuzung untereinander. Diese Art der Vermehrung führt zu einem

Hybridschwarm, der die Eltern mehr oder weniger kontinuierlich verbindet. Betula carpatica z.B. ist nach NATHO eine selbständige Art, die durch Introgression von Merkmalen von Betula pendula in die Moorbirke entstanden ist:

Der knorrige Baum oder Strauch besitzt braune bis braun-gelbe Rinde. Die Zweige und Blätter sind kahl. Das Blatt ist oberhalb der Mitte am breitesten. Die Randzähnung ähnelt der von Betula pendula, ist jedoch einfach. Das Nüßchen ist breit-oval, während die Flügel oft etwas gewölbt sind. Der Mittellappen der Fruchtschuppe ist gestreckt und die Seitenlappen sind trapezförmig-gerundet, etwas zurückgebogen. Sämtliche übrigen Merkmale sind wie bei Betula pubescens.

III Bisherige Untersuchungen über das Vorkommen von Triterpenen in den Rinden von Betula pendula und Betula pubescens

Soweit bekannt, wurde bei bisherigen Untersuchungen nicht zwischen Betula pendula und Betula pubescens differenziert. Es werden lediglich Untersuchungen der Rinde von Betula alba L. beschrieben. Da Betula alba L. jedoch nach der Aufteilung der Großart in die beiden Arten Betula pendula Roth und Betula pubescens Ehrh. als Synonym zu gelten hat, lassen die Autoren damit offen, ob das verwendete Material von der Moorbirke oder der Hängebirke stammt:

1788 wurde erstmalig die weiße Substanz der Rinde von Betula alba L. durch LOWITZ isoliert, die 1831 von MASON den Namen Betulin erhielt. VESTERBERG (47) erkannte im Jahre 1922 ihre Bruttoformel, $C_{30}H_{48}(OH)_2$ Als Ergebnis zahlreicher Untersuchungen (42) ist für diese Verbindung die Struktur eines 2,28-Dihydroxy-$\Delta^{20:29}$-lupens gesichert (Formel siehe Seite 45).

Acetyloleanolsäure wurde 1934 von RUZIČKA, FRAME, LEICESTER, LIGUORI und BRUNGGER (35) aus der Rinde von Betula alba L. isoliert und folgend als ein Vertreter der ß-Amyringruppe identifiziert: 2-Acetyl-$\Delta^{12:13}$-28-oleanensäure (Formel siehe Seite 47).

Etwa gleichzeitig mit der von mir durchgeführten Untersuchung wiesen HEJNO, JAROLÍM und ŠORM (17) in dem weißen Teil der Rinde einer Birke (die Art wurde in der Veröffentlichung nicht näher beschrieben) mehrere Triterpene nach, die teilweise mit den Verbindungen identisch sind, die aus meinen Drogen isoliert worden sind. HEJNO, JAROLÍM und ŠORM identifizierten Betulin, Lupeol, Allobetulin, Betulinsäure, einen Betulinester und zwei nicht näher charakterisierte acetylierte Hydroxylactone als Bestandteile ihrer Rinde.

IV Biogenese und Endausgestaltung der Triterpene (34, 41)

Das Thema "Biogenese und Endausgestaltung der Triterpene" ist geeignet, mit der Chemie dieser Naturstoffe vertraut zu machen. Es behandelt die Entwicklung der Vorstufen der Triterpene innerhalb der Gesamtbiogenese der Terpene, die Entstehung der verschiedenen Grundtypen der cyclischen Triterpene aus der aliphatischen Vorstufe Squalen und abschließend die Möglichkeiten, durch die sich diese Grundtypen sekundär verändern können.

Eine wichtige Hilfe bei der Aufklärung einer Biogenese ist eine leistungsfähige Arbeitshypothese. Eine solche wurde in der Terpenchemie von WALLACH (49) mit der "Isopren-Hypothese" aufgestellt und vor allem von RUZICKA und seinen Mitarbeitern (33, 34) weiterentwickelt. Diese empirische Isopren-Regel besagt, daß Terpene und Terpenoide in der Natur aus Isopren- bzw. Isopentaneinheiten aufgebaut werden. Sie genügte insofern den Ansprüchen, als daß sich die damals bekannten Terpene mit wenigen Ausnahmen formal in C_5-Einheiten zerlegen ließen und bei der Konstitutionsaufklärung solcher Verbindungen die Zahl der möglichen Formeln eingeschränkt wurde. Es bereitete jedoch Schwierigkeiten, zu belegen, daß solche C_5-Einheiten wirklich als Bausteine in der Natur vorkommen. Ein entscheidender Fortschritt in diesem Zusammenhang resultierte aus der Entdeckung der Mevalonsäure durch FOLKERS und Mitarbeiter (52, 53). Durch Arbeiten der Gruppe BLOCH (53) wurde herausgestellt, daß diese Mevalonsäure die bis zum damaligen Zeitpunkt interessanteste isoprenartige Einheit war. Weitere Untersuchungen von BLOCH und LYNEN (29, 25) ergaben dann, daß das "aktive Isopren", d.h. die wirkliche C_5-Einheit in der Natur in Form des Isopentenylpyrophosphats bzw. des Dimethylallylpyrophosphats vorliegt. Das Isopentenylpyrophosphat entsteht aus der Mevalonsäure durch Decarboxylation und Phosphorylierung; eine spezifische Isomerase,

Isopentenylpyrophosphat - Isomerase, isomeriert die Verbindung zum γ,γ-Dimethylallylpyrophosphat. Mit Hilfe dieser neuen Daten konnte ein zusammenhängendes Schema der Biogenese der Terpene und Terpenoide aufgestellt werden, das im wesentlichen auf Arbeiten von LYNEN (41) basiert (nach SANDERMANN (41)):

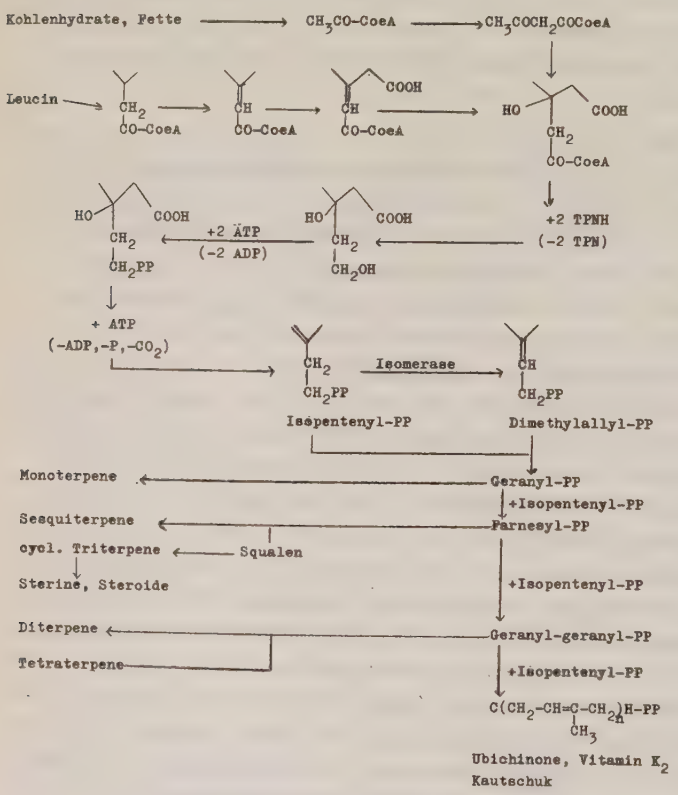


Abb. 1 Schematische Darstellung der Biogenese von Terpenen und Terpenoiden (Zeichenerklärung: ADP und ATP=Adenosindi- und Adenosintriphosphat, TPNH und TPN=reduziertes und oxydiertes Triphosphopyridinnukleotid, CoeA=Coenzym A, PP=Pyrophosphat)

Das Schema zeigt, daß die Zwischenstufe ß-Hydroxy-ß-methylglutaryl-CoeA a) aus Fetten und Kohlenhydraten über das Acetyl-CoeA und Acetoacetyl-CoeA und b) aus Leucin (= Eiweisstoffwechsel) über die CoeA-Verbindungen der Isovaleriansäure, ß-Methylcrotonsäure und ß-Methylglutaconsäure entsteht. In Gegenwart von TPNH erfolgt die Reduktion der Thioestergruppe, es entsteht Mevalonsäure, die sofort zum Pyrophosphat phosphoryliert wird. Weitere Reaktionen mit ATP, unter Verlust von CO_2 und Phosphorsäure, führen zum Isopentenylpyrophosphat. Die weiteren Schritte über dieses "aktive Isopren" hinaus wurden vor allem durch die Untersuchungen LYNENS geklärt. Das Isopentenylpyrophosphat isomeriert zum γ,γ-Dimethylallylpyrophosphat. Die Entstehung dieser Verbindung ist wichtig, da sie als Starter für den folgenden Aufbau der Terpenkohlenstoffketten dient. Durch Kondensation der beiden C_5-Körper wird der C_{10}-Körper Geranylpyrophosphat gebildet, von dem sich sämtliche Monoterpene ableiten. Die Addition einer weiteren Isopentenylgruppe an diese Verbindung führt zum Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat, durch Schwanz-an-Schwanz-Kondensation zweier dieser C_{15}-Ketten entsteht Squalen. Von dieser Verbindung leiten sich sämtliche Triterpene und Steroide ab.

Wie das Schema zeigt, bauen sich Diterpene, Carotinoide, Ubichinone, Vitamin K und Kautschuk in entsprechenden Reaktionen auf.

Die Konstitutionsaufklärung der cyclischen Triterpene führte zu der Erkenntnis, daß diese Verbindungen nicht mehr exakt der "empirischen Isoprenregel" gehorchten. Es zeigte sich nämlich, daß diese Kohlenstoffgerüste nicht vollständig in Isoprenreste zerlegbar sind (48, 34). Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, daß sich die cyclischen Triterpene aus dem der "empirischen Isoprenregel" gehorchenden Squalen ableiten lassen. Diese Erkenntnisse haben zu einer erweiterten Hypothese geführt, der "biogenetischen Isoprenregel" (33, 14).

Nach dieser Regel werden Terpene als Verbindungen definiert, deren Kohlenstoffgerüste sich aus aliphatischen Vorstufen vom Typ des Geraniols, Farnesols, Geranylgeraniols oder Squalens nach bekannten Cyclisations- und Umlagerungsmechanismen der organischen Chemie ableiten lassen. Diese Ableitungen führen entweder zu den genauen Strukturformeln der Naturverbindungen oder zu Analoga, von denen man erst durch Oxydations- oder Reduktionsoperationen zu den Naturverbindungen gelangt.

Diese "biogenetische Isoprenregel" ist, genauso wie es die empirische war, in erster Linie eine Arbeitshypothese, die die Konstitutionsaufklärung erleichtern soll. Ihre Leistungsfähigkeit wurde dadurch bewiesen, daß ESCHENMOSER (14) mit ihrer Hilfe eine lückenlose Ableitung aller 13 bekannten Stammvertreter (Grundtypen) der cyclischen Triterpene, ausgehend vom Squalen, gelang. Diese Ableitungen beruhen auf der konsequenten Einhaltung folgender Annahmen, die den Reaktionsmechanismus der Cyclisation und die dazu günstige Konfiguration und Konstellation des Squalens betreffen:

I Cyclisationen sollen ausnahmslos nach dem Prinzip der antiparallelen Addition erfolgen.

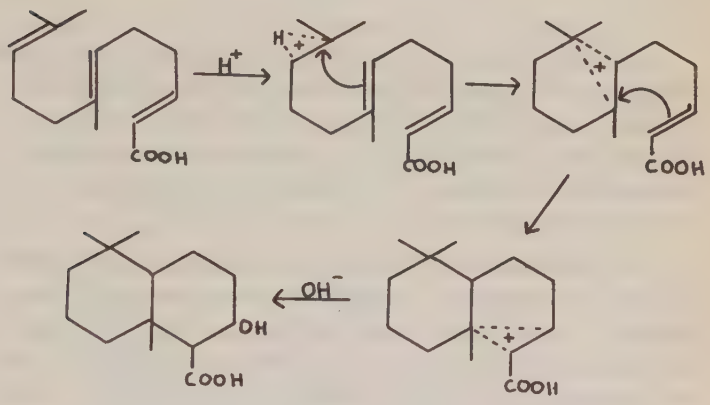
II Wagner'sche Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts, 1,2-wanderungen von CH_3-Gruppen und H-Atomen sowie H-Eliminationen sollen nur in solchen Fällen auftreten, wo die entsprechend optimalen stereochemischen Voraussetzungen erfüllt sind.

III Alle Teilreaktionen vom Squalen bis zu den Endprodukten seien Non-stop-Reaktionen, d.h. es sollen keine stabilen Verbindungen als Zwischenprodukte auftreten.

IV Die Cyclisationen sollen an einem Squalen erfolgen, dessen 4 mittlere Doppelbindungen trans-Konfiguration aufweisen.

V Die Cyclisation soll von ganz bestimmten Konstellationen, d.h. einer ganz bestimmten Folge von Sessel- und Wannenfaltungen der Squalenkette, ausgehen.

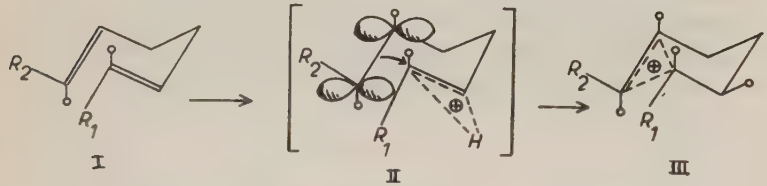
Bevor an einigen Beispielen die Ableitungen von Stammvertretern cyclischer Triterpene behandelt werden, seien einige der in diesen Annahmen auftretende Begriffe näher erläutert. Der Begriff der antiparallelen Addition wird in der folgenden Abbildung an dem Beispiel der säurekatalysierten Cyclisation der trans-Apofarnesylsäure (ESCHENMOSER (34))veranschaulicht:



Das Reaktionsschema zeigt, daß diese antiparallelen Additionen über die Zwischenstufen relativ stabiler "nichtklassischer Ionen" (andere adäquate Ausdrücke: bridged cation (28), π -Komplex (7), synartetic cation (19), enchimeric cation (50)) verlaufen. Die jeweils neu entstehenden "nichtklassischen Ionen" greifen dabei die sich gerade abbauenden in der elektrophilen, rückwärtigen Antistellung an. Der Vorgang verläuft synchron, d.h. das neue Ion wird in dem Maße aufgebaut, in dem sich das alte abbaut (Non-stop-Reaktion).

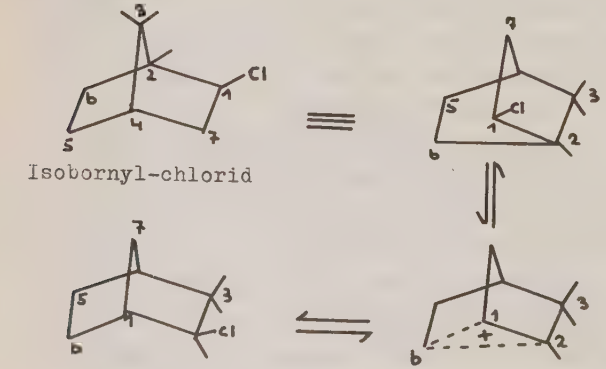
Voraussetzung für eine solche streng stereospezifische Reaktion ist, daß die Ausgangsverbindung in einer

energetisch günstigen Konstellation vorliegt. Die Sesselfaltung erfüllt diese Bedingung:



Wie das fiktive Modell der Cyclisation eines Diens zeigt, ist die ideale Sesselfaltung des "nichtklassischen Ions II durch die räumliche Nähe und die Anordnung der π-Orbitale der Doppelbindung gegenüber dem Acceptorzentrum der CH-Bindung ausgezeichnet (nach L. RUZICKA (34)).

Die Camphenumlagerung ist ein klassisches Beispiel für die in Annahme II erwähnte wagner-Meerwein-Umlagerung+. Diese reversible, intramolekulare Umlagerung des Isobornylchlorids zum Camphenhydrochlorid ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt. Auch der Mechanismus dieser Reaktion läßt sich nur erklären, wenn man für die Zwischenstufe ein "nichtklassisches Ion" annimmt:



+RUZICKA schlug 1918 für den Typus der Camphen-Umlagerung die Bezeichnung Wagner-Umlagerung vor (32).

Zu Annahme V ist zu bemerken, daß bei der Entstehung einzelner Triterpene in bestimmten Fällen die Wannenfaltung der an sich begünstigteren Sesselfaltung vorgezogen wird. In der biologischen Synthese ist es Aufgabe spezifischer Enzyme, die zweckmäßigsten Faltungen vorzunehmen. Es ist denkbar, daß das enzymatisch aus Acetat aufgebaute Squalen bereits in einer für die Cyclisation günstigen Faltung vorliegt. Da aber auch von außen zugeführtes Squalen z.B. zu Lanosterin verarbeitet wird, muß das gestreckte Molekel auch nachträglich enzymatisch in eine solche günstige Faltung gebracht werden können.

Die Abweichungen im Bau der verschiedenen Triterpentypen sind auf diese Konstellationen des Squalen-Moleküls zurückzuführen, die je nach Enzymsystem der Pflanze verschiedenartig ausfallen. Für die Ableitung der Stammvertreter der cyclischen Triterpene sind folgende Faltungen des Squalens erforderlich:+

SSgg(S)	Ambrein
SSgSS	Onocerin
SSSwg	Dammarendiole, Euphol, Tirucallol
SSSWW	Lupeol, Taraxasterol, α-Amyrin, Germanicol, ß-Amyrin, Taraxerol, Friedelin
SWSWg	Lanosterin

Die Mechanismen, die zu den tetracyclischen und pentacyclischen Stammvertretern führen, werden in dem folgenden Teil behandelt (nach RUZICKA (34)).

Die Cyclisationen werden stets oxydativ, d.h. potentiell mit einem Hydroxyl-Kation eingeleitet. Das Schema der antiparallelen Addition hat zur Folge, daß diese am C-2 eingeführte Hydroxylgruppe äquatorial zu liegen kommt, da die trans-Konfiguration des Squalens die Reaktionsebene der Cyclisation in eine äquatoriale Fläche legt.

+ S=Sesselfaltung; W=Wannenfaltung; g=gestreckt

Die erste Phase der Cyclisation der SSSWg-Konstellation des Squalens (I) führt zu der Zwischenstufe II, die sich in drei Richtungen stabilisieren kann:

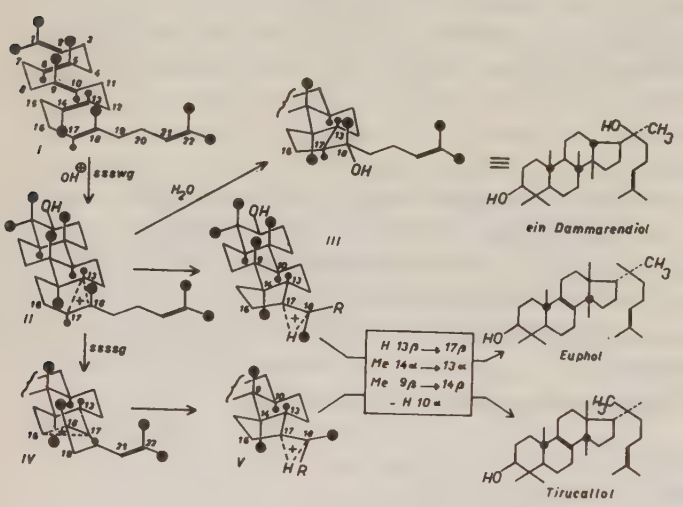


Abb. 2 Entstehung der Stammvertreter Dammarendiol, Euphol und Tirucallol (entnommen aus "Perspectives in Organic Chemistry", L. RUZICKA (34))

Durch Hydratation am C-18 entsteht eines der beiden stereoisomeren Dammarendiole.

In der Zwischenstufe II liegen aber auch optimale stereochemische Voraussetzungen für successive 1,2-Wanderungen von H-Atomen und Methylgruppen vor. Die nach dem antiparallelen Prinzip ablaufende Folge von 1,2-Verschiebungen, die von der Stufe III zum tetracyclischen Stammtreter Euphol führt, wird nämlich durch die abwechselnde α- und β-Stellung der beteiligten Substituenten begünstigt.

Als dritte Reaktionsrichtung führt eine Wagner-Umlagerung unter Beteiligung der Methylengruppe 16 zu der Zwischenstufe IV. Verbunden mit dieser Umlagerung ist

ein Konstellationswechsel des Ringes D von der Wanne zum Sessel. Stufe IV kann, unter Teilnahme des H-17 α, in die Zwischenstufe V mit fertigausgebildetem tetracyclischen Ringsystem übergehen. Dabei entsteht aber (als Folge des Konstellationswechsels des Ringes D) am C-18 die umgekehrte Konfiguration verglichen mit dem Euphol. Die gleiche Folge von 1,2-wanderungen, die von III zum Euphol führte, läßt hier das Tirucallol aus der Zwischenstufe V entstehen.

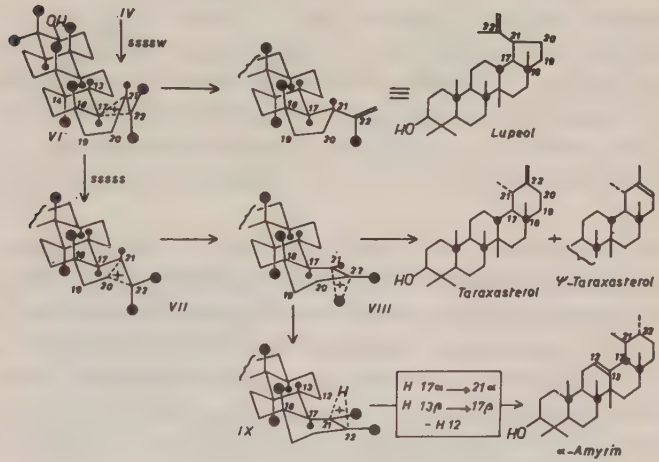


Abb. 3 Entstehung der Stammvertreter Lupeol, Taraxasterol und α-Amyrin (entnommen aus "Perspectives in Organic Chemistry", L. RUZICKA (34))

Von IV gelangt man durch Anfügung eines weiterer Cyclisationsschrittes zu der Zwischenstufe VI, die zu allen pentacyclischen Stammvertretern führt. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß der Ringschluß zwischen dem C-17 und der Doppelbindung in der Wannenfaltung des Ringes E erfolgt, während Ring D in der Sesselfaltung verbleibt.

Das Formelschema zeigt, daß aus Ring E über das nichtklassische Ion C-17, C-21, C-22 sowohl ein 5-Ring als auch ein 6-Ring entstehen kann. Im ersteren Falle leitet sich von der Zwischenstufe VI unmittelbar das Lupeol durch Eliminierung eines Protons ab.

Die bei Ring D beschriebene Wagner-Umlagerung, verbunden mit dem Konstellationswechsel Wanne ⟶ Sessel, kann sich im Ring E wiederholen und führt dann zu der Zwischenstufe VII, in der der Ring E als 6-Ring vorliegt. Diese ionogene Stufe stabilisiert sich nun wieder durch verschiedene Folgen von 1,2-Verschiebungen.

Wandert die Methylgruppe vom C-22 nach C-21 α, so gelangt man zu den Taraxasterolen und dem α-Amyrin. Dieser Typus der Stammvertreter ist durch die zwei einzelstehenden Methylgruppen im Ring E charakterisiert. Beim Taraxasterol wandert die α-Methylgruppe (vgl. VIII) vom C-22 nach C-21 α, was die trans-Konfiguration D/E erhält.

Zur Entstehung des α-Amyrins wandert die α-Methylgruppe vom C-22 nach C-21 α und das H-21ß nach 22ß, wodurch die Methylgruppe am C-22 (ursprünglich ß-ständig) in die α-Stellung zu liegen kommt. Damit gekoppelt sind die im Formelschema angegebenen 1,2-Wanderungen, wobei die Methylgruppe am C-21 in ß-Stellung kommt. Durch Abwanderung der Doppelbindung vom Ring E in den Ring C besitzt D/E cis-Konfiguration.

Beginnen die 1,2-Wanderungen bei der Zwischenstufe VII ohne Mitwirkung der geminalen Dimethylgruppe im Ring E, so entstehen vier Stammvertreter, die sich voneinander nur dadurch unterscheiden, daß diese successiven 1,2-Verschiebungen das pentacyclische Ringsystem verschieden weit durchwandern:

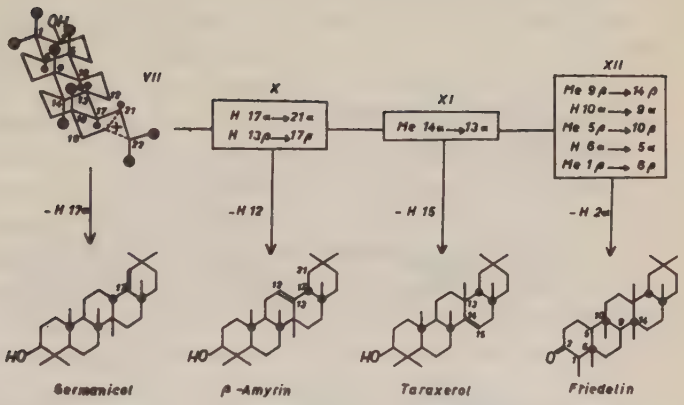


Abb. 4 Entstehung der Stammvertreter Germanicol, ß-Amyrin, Taraxerol und Friedelin (entnommen aus "Perspectives in Organic Chemistry", L. RUZICKA (34))

Stabilisiert sich das nichtklassische Ion der Zwischenstufe VII noch im Ring E durch Eliminierung eines Protons (H-17 α), so entsteht der Stammvertreter Germanicol.

Eine zweimalige 1,2-Wanderung, die mit der Eliminierung des Protons H-12 (unter Ausbildung der Doppelbindung zwischen C-12 und C-13) endet, führt zum Stammvertreter ß-Amyrin.

Besonders bemerkenswert ist die zum Friedelin führende Serie von 1,2-Wanderungen, die das ganze Ringsystem vom Ring E bis zum Ring A durchläuft.

Kurz gestreift sei noch die Entstehung des tetracyclischen Lanosterins. Der Reaktionsweg, der zu diesem Stammvertreter führt, ist ganz analog dem, der vom Squalen über drei Zwischenstufen zum Tirucallol führt

(vgl. Seite 22). Jedoch ist die Konstellationsvoraussetzung nicht wie dort eine SSSWg-, sondern eine SWSWg-Faltung des Squalens.

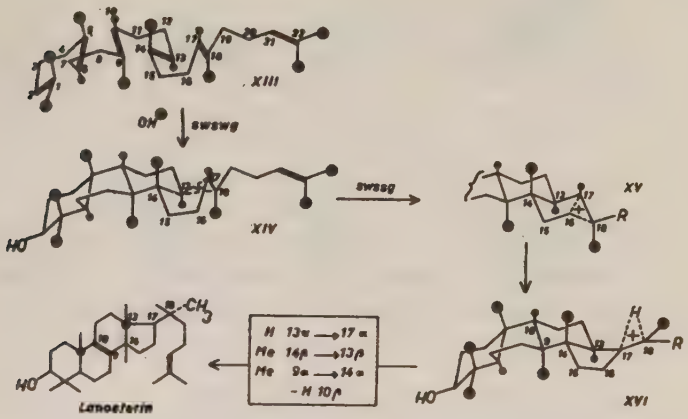


Abb. 5 Entstehung des Stammvertreters Lanosterin (entnommen aus "Perspectives in Organic Chemistry", L. RUZICKA (34))

Die Ableitungen der cyclischen Triterpene aus der aliphatischen Vorstufe Squalen führen entweder zu den genauen Strukturformeln der Naturstoffe oder zu Analoga, von denen man erst durch Oxydations- oder Reduktionsoperationen zu den Naturverbindungen gelangt. Der Weg, der zu dem ersteren Typus der Endausgestaltung, d.h. zu den Stammvertretern führt, ist bereits mit der Ableitung dieser Verbindungen behandelt. Der exakte Mechanismus, der zu den oxydierten oder reduzierten Stammvertretern führt, ist nur in sehr wenigen Fällen bekannt (41). Im folgenden Teil werden daher nur zwei häufige Reaktionstypen, die den Stammvertreter verändern können, beschrieben: Einführung von OH-Gruppen und die Methylgruppenoxydation.

Die Einführung von OH-Gruppen in den Stammvertreter kann durch direkte Oxydation, durch Reduktion einer Aldehyd- oder Ketogruppe oder Hydratation einer Äthylenbindung erfolgen. Die letztere Möglichkeit ist vor allem bei Monoterpenen untersucht worden. So entsteht zum Beispiel das Terpineol durch Hydratation des Limonens. ASAHINA und ISHIDATE (2) beschreiben Beispiele der direkten Oxydation. Füttert man zum Beispiel Hunde mit Campher, so kann man anschließend 3-Oxy- und 5-Oxycampher isolieren. Es wird nun vermutet, daß die Pflanzen eine ähnliche Fähigkeit für solche Hydroxylationen besitzen. Man kennt Pilze, die in der Lage sind, OH-Gruppen in Steroide vor allem in Stellung 6ß, 11 α und ß und 17 α einzuführen (6).

Die häufigste Veränderung erfahren die Stammvertreter der Triterpene durch die Methylgruppenoxydation. Sie scheint in der Pfalnze eine besonders begünstigte Reaktion zu sein. Die Methylgruppen werden dabei über folgende Stufen oxydiert:

$$-CH_3 \longrightarrow -CH_2OH \longrightarrow -CHO \longrightarrow -COOH$$

Die einzelnen Oxydationsschritte können mitunter nebeneinander in der gleichen Pflanze nachgewiesen werden.

Der nächste Schritt im Verlauf dieser Reaktionsfolge ist die oxydative Entmethylierung. Durch Decarboxylation der vorher zur Säuregruppe oxydierten Methylgruppe entstehen auf diese Weise aus dem C_{30}-Kohlenstoffgerüst der Triterpene C_{29}-, C_{28}- oder auch C_{27}-Körper (Steroide).

Eigene Untersuchungen

Hauptteil

A) Untersuchung der Triterpenführung der Rinde von Betula pendula

Während Betula pubescens in Berlin ein seltener Baum ist, kommt Betula pendula häufig vor. Es schien daher für den Ablauf der Untersuchungen sinnvoll, die Analysenmethoden für den phytochemischen Vergleich der Rinden von Betula pendula und Betula pubescens mit der reichlich vorhandenen Droge von Betula pendula zu erarbeiten und anschließend das Material von Betula pubescens (sowie eventuell von Betula carpatica) zu prüfen.

1.) Qualitativer Nachweis der Triterpene

Betulin und Acetyloleanolsäure waren bereits vor Beginn dieser Untersuchungen als Bestandteile der Birkenrinde beschrieben worden. Es galt nun als erstes festzustellen, ob das vorliegende Drogenmaterial von Betula pendula neben diesen beiden bekannten Verbindungen weitere Triterpene enthielt. Diese Frage konnte bejaht werden. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gelang es, in einem Cyclohexanextrakt der Droge insgesamt 8 Substanzen nachzuweisen, die mit Chlorsulfonsäure positiv reagierten, also sehr wahrscheinlich Triterpene oder eventuell Steroide darstellten (s. Abb. 16). Diese 8 Substanzen wurden für den phytochemischen Vergleich der Rinden von Betula pendula und Betula pubescens herangezogen.

Der Nachweis von Triterpenen mit Chlorsulfonsäure ist sehr empfindlich. Nach TSCHESCHE, LAMBERT und SNATZKE (46) lassen sich zum Beispiel noch 0,02 µg Oleanolsäure mit diesem Reagenz nachweisen. Diese Tatsache ist eine Gewähr dafür, daß für die Untersuchungen auch Triterpene erfaßt wurden, die in geringer Konzentration in der Rinde vorliegen.

2.) Isolierung der Triterpene

Betulin ist unter den Inhaltsstoffen der Birkenrinde die sehr stark überwiegende Komponente (nach SOSA (43) bis zu 25 % der Korkschicht der Rinde). Da das Interesse der Untersuchungen aber vor allem den übrigen Triterpenen galt, mußte für die Extraktion ein Verfahren gefunden werden, das diese restlichen Triterpene anreichert, das Betulin dagegen möglichst weitgehend abtrennt.
Diese Bedingungen wurden erfüllt, wenn man die Droge mit Cyclohexan extrahierte. Aus dem Cyclohexanextrakt schied sich der Hauptteil des Betulins im Kühlschrank als kristalliner Niederschlag ab, während die übrigen Triterpene in der Mutterlauge gelöst blieben. Aus dem Verdampfungsrückstand dieser Mutterlaugen, $E._{pen}$, wurden die dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen Triterpene isoliert.

Für die präparative Trennung der Triterpene wurde das System der Dünnschichtchromatographie leicht abgewandelt auf die Säulenchromatographie übertragen. Der Verdampfungsrückstand der Mutterlaugen, $E._{pen}$, wurde nacheinander an 2 Säulen unter verschiedenen Bedingungen chromatographiert. Mittels Adsorptionschromatographie an Kieselgel H gelang es an einer Säule 1 mit Methylenchlorid als Eluens die Verbindungen aufzutrennen, die auf dem Dünnschichtchromatogramm (s. Abb. 16) einen Rf-wert $\geq$ Rf-Wert$_{Betulin}$ besitzen. Auf diese Weise wurden aus den beiden ersten Fraktionen etwa 30 mg der Verbindung c (ca. 0,012 % [+]) vom Schmelzpunkt 164 - 166° und 500 mg der Verbindung d (ca. 0,200 %) vom Schmelzpunkt 212 - 215° isoliert. Die mittleren Fraktionen dieser Säule lieferten etwa 80 mg der Substanz e_1 (ca. 0,032 %) vom Schmelzpunkt 190 - 192° und 70 mg der Verbindung e_2 (ca. 0,028 %) vom Schmelzpunkt 138 - 139°. Das weitere Eluat enthielt etwa 2500 mg der Substanz B

[+] Die in den Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf das Gewicht der luftgetrockneten Droge.

(mit dem Rückstand des Vorlaufs der Säule II ca. 1,080 %) vom Schmelzpunkt 253 - 255°. Abschließend wurde mit einem Chloroform-Aceton-Gemisch die Fraktion n eluiert, die neben wenig Substanz B noch die Substanzen f, g_2 und H enthielt.

Diese Substanzen der Fraktion n, die einen Rf-Wert $\leq$ Rf-Wert$_{Betulin}$ besitzen, wurden anschließend auf einer Säule II (Kieselgel H, Chloroform-Aceton) getrennt. Während der Vorlauf einen Rest der Substanz B enthielt, lieferten die mittleren Fraktionen 50 mg der Verbindung f (ca. 0,010 %) vom Schmelzpunkt 256 - 258° und 105 mg der Substanz g_2 (ca. 0,021 %) vom Schmelzpunkt 308 - 311°. Die folgende Fraktion enthielt wenig der Substanz H, die sich durch eine geringe Neigung zur Kristallisation auszeichnete. Das restliche Eluat hinterließ nach dem Entfernen des Lösungsmittels Spuren einer braunen, harzigen Masse, die nicht näher untersucht wurde.

Der gesamte Trennungsgang ist auf Seite 32 noch einmal schematisch dargestellt.

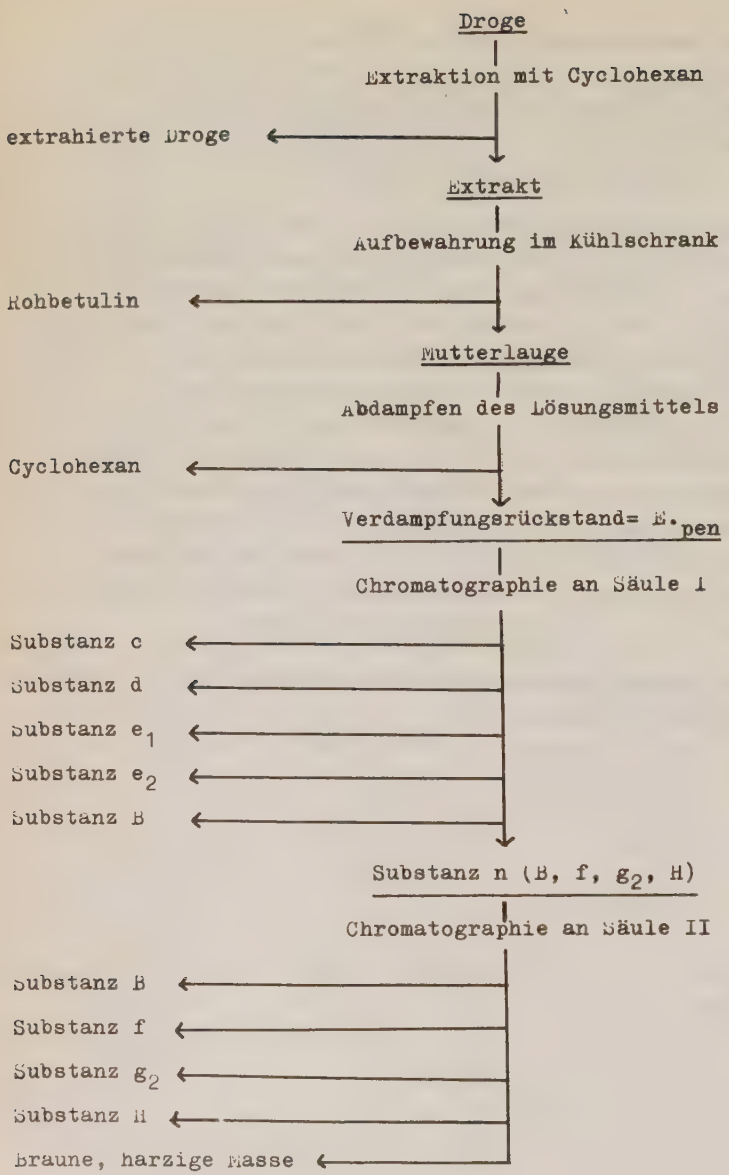


Abb. 6 Schematische Darstellung des Trennungsganges bei der Isolierung der Triterpene aus der Rinde von Betula pendula

3.) Identifizierung der isolierten Verbindungen

Die Identifizierung der isolierten Verbindungen wurde dadurch erleichtert, daß der größte Teil dieser Substanzen das gleiche Kohlenstoffgerüst wie das Betulin besitzt. Betulin war in Anlehnung an eine Vorschrift von RUZICKA und ISLER (36) aus der Rinde von Betula pendula isoliert worden und stand als Vergleichssubstanz zur Verfügung. So war bei der Klärung der Formeln der Verbindungen neben den positiven Farbreaktionen mit Chlorsulfonsäure und Antimon-V-Chlorid, die sie allgemein als Triterpene oder eventuell Steroide auswiesen, vor allem der Vergleich ihrer IR-Spektren mit dem des Betulins richtungsweisend. Abb. 3 zeigt das IR-Spektrum der Vergleichssubstanz Betulin, das für diese Vergleiche in der folgenden Tabelle 1 (s. Seite 34) möglichst genau interpretiert wurde.

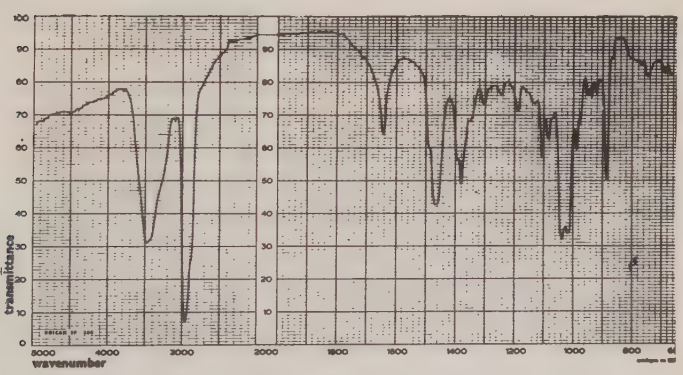


Abb. 7 IR-Spektrum der Vergleichssubstanz Betulin

$\tilde{\nu}_{max}$ $[cm^{-1}]$	Zuordnung (3)	Interpretation (3)
3450	OH-Valenzschwingung	OH-Gruppen
3095	CH-Valenzschwingung	$R_1R_2C=CH_2$
2960	CH-Valenzschwingung	CH_3 u. CH_2
2860	CH-Valenzschwingung	CH_3 u. CH_2
1640	C=C Valenzschwingung	$R_1R_2C=CH_2$
1460	CH-Deformationsschwingung	$C-CH_3$ u. $-CH_2-$
1380	CH-Deformationsschwingung	$C-CH_3$ u. $-CH_2-$
1340	CH-Deformationsschwingung	$\rangle C-H$
1040	OH-Deformations- und C-O Valenzschwingung	OH-Gruppe im 6-Ring (sekundär)
1020	OH-Deformations- und C-O Valenzschwingung	OH-Gruppe im 6-Ring (primär)
885	CH_2-Waggingschwingung	$R_1R_2C=CH_2$

Tabelle 1 Charakteristische Absorptionsbanden des IR-Spektrums von Betulin

a) Identifizierung der Verbindung c

Das IR-Spektrum der Verbindung c unterscheidet sich von dem des Betulins dadurch, daß es nicht mehr die Banden aufweist, die für beide Hydroxylgruppen des Betulins charakteristisch sind; dafür treten aber neue Absorptionen auf, die je einer Aldehyd- und einer Ketogruppe zugeordnet werden konnten. Da die IR-Spektren der beiden Verbindungen in den übrigen Bereichen jedoch übereinstimmen, konnte vorausgesetzt werden, daß sich die Verbindungen c und Betulin nur durch ihre funktionellen Gruppen unterscheiden. Es wurde vermutet, daß die Verbindung c mit Betulonaldehyd, einem Oxydationsprodukt des Betulins, identisch ist. Diese Annahme konnte durch die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen erhärtet werden:

Für den in der Literatur (38) beschriebenen Betulonaldehyd wird der Schmelzpunkt bei 165 - 166° angegeben; die Verbindung c schmilzt bei 164 - 166°. Auch der für das entsprechende Dioxim aufgeführte Schmelzpunkt von 247° stimmt gut mit dem des dargestellten c-Dioxims, 245 - 247°, überein. Auf Grund der Elementaranalyse kommt der Verbindung c mit $C_{30}H_{46}O_2$ die Bruttoformel des Betulonaldehyds zu; die C, H, N-Werte des c-Dioxims entsprechen dem Betulonaldehyddioxim.

Um die Identität der Verbindung c mit Betulonaldehyd zu beweisen, wurde authentischer Betulonaldehyd dargestellt und mit c verglichen. Die Darstellung des Betulonaldehyds erfolgte nach einer Vorschrift von RUZICKA und REY (38), nach der Betulin einer Dehydrierung mit Kupferpulver bei 300° unterzogen wurde. Dabei wird das primäre Hydroxyl zur Aldehydgruppe und das sekundäre zur Ketogruppe oxydiert. Die authentische Probe stimmte in allen geprüften Eigenschaften mit der Verbindung c überein (s. Tab. 2). Damit war die Konstitution der Verbindung c bewiesen:

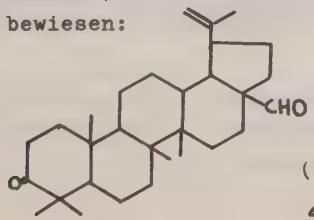


Abb. 8 Verbindung c (Betulonaldehyd; 2,28-dioxo $\Delta^{20;29}$ lupen)

Diese Verbindung ist erstmals aus einer Pflanze isoliert worden.

	Verbindung c	Betulonaldehyd
Schmp.	164 - 166°	164 - 166°
Misch-Schmp.	164 - 166°	
Schmp. des Eutektikums mit Benzanilid	126°	126°
Rf-Wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,92	0,92
Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure	braun	braun
Farbreaktion mit Antimon-V-Chlorid	gelb	gelb

Die IR-Spektren der beiden Verbindungen sind im Bereich 5000 - 650 cm^{-1} identisch.

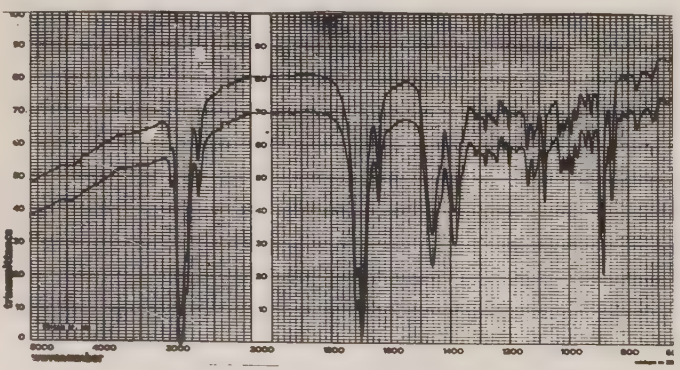


Tabelle 2 Vergleich der Verbindung c mit authentischem Betulonaldehyd

b) Identifizierung der Verbindung d

Das IR-Spektrum der Verbindung d unterscheidet sich von dem des Betulins dadurch, daß in ihm die Absorption fehlt, die im Spektrum des Betulins das primäre Hydroxyl charakterisiert. Da in den übrigen Bereichen die IR-Spektren der beiden Verbindungen übereinstimmen, wurde vermutet, daß die Verbindungen d und Betulin das gleiche Kohlenstoffgerüst besitzen und sich nur dadurch unterscheiden, daß in der Formel der Verbindung d das primäre Hydroxyl fehlt. Verbindung d käme somit die Formel eines 2-Hydroxy-$\Delta^{20:29}$lupens zu. Eine solche Verbindung ist mit dem Lupeol schon mehrfach aus Pflanzen isoliert worden. Die für sie in der Literatur aufgeführten Daten stimmen gut mit denen der Verbindung d überein:

Der Schmelzpunkt wird für Lupeol bei 212 - 215° (21), 215° (11) und 210 - 212° (31) angegeben, die Verbindung d schmilzt im Intervall 212 - 215°. Auf Grund der Elementaranalyse wurde für die Verbindung d die Bruttoformel $C_{30}H_{50}O$ errechnet, die dem Lupeol entspricht. Das d-Acetat schmilzt bei 217 - 218°, die Literatur gibt für Lupeolacetat den Schmelzpunkt 218° (11) an. Die C, H, N-Werte des d-3,5-Dinitrobenzoats, das zum Beweis der sekundären OH-Gruppe dargestellt wurde, entsprechen dem Lupeol-3,5-dinitrobenzoat.

Die Identität der Verbindung d mit Lupeol wurde durch den Vergleich mit einer authentischen Probe bewiesen. Die Vergleichssubstanz Lupeol wurde nach einer Vorschrift von LIKIERNIK (22) aus den Samen von Lupinus luteus isoliert. Sie stimmte in allen geprüften Eigenschaften mit der Verbindung d überein (s. Tab. 3). Damit war die Konstitution der Verbindung d geklärt:

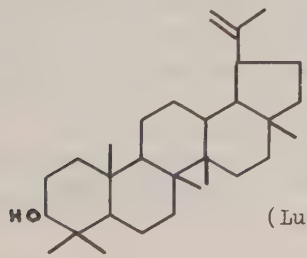


Abb. 9 Verbindung d
(Lupeol; 2-Hydroxy-$\Delta^{20:29}$lupen)

	Verbindung d	Lupeol
Schmp.	212 - 215°	212 - 215°
Misch-Schmp.	212 - 215°	
Schmp. des Eutektikums mit Saccharin	196°	196°
Rf-wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,77	0,77
Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure	rotbraun	rotbraun
Farbreaktion mit Antimon-V-Chlorid	rotviolett	rotviolett

Die IR-Spektren der beiden Verbindungen sind im Bereich 5000 - 650 cm^{-1} identisch.

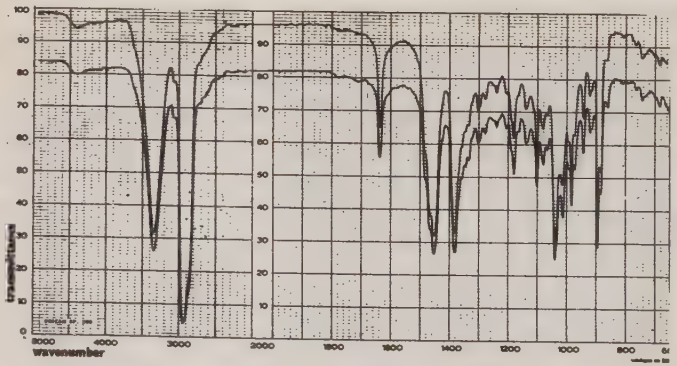


Tabelle 3 Vergleich der Verbindung d mit authentischem Lupeol

Das Vorkommen von Lupeol neben Betulin in der Birkenrinde läßt sich auch aus dem biogenetischen Verwandtschaftsverhältnis der beiden Verbindungen vermuten. Der Stammvertreter Lupeol muß nämlich zwangsläufig als die Muttersubstanz des Betulins vorhanden sein, da das Betulin im Biogeneseablauf erst sekundär durch Oxydation aus dem Lupeol entsteht.

c) Identifizierung der Verbindung e_1

Wurden die IR-Spektren der Verbindungen e_1 und Betulin verglichen, so ergab sich folgendes Bild:

Das IR-Spektrum der Verbindung e_1 unterscheidet sich von dem des Betulins dadurch, daß in ihm die Absorption fehlt, die im Spektrum des Betulins für die primäre OH-Gruppe typisch ist; dafür treten jedoch neue Banden auf, die einer Aldehydgruppe zugeordnet werden konnten. In den übrigen Bereichen sind die beiden Spektren identisch.

Auf Grund dieser Anhaltspunkte wurde für die Verbindung e_1 die Formel des Betulinaldehyds vermutet. In dieser Verbindung ist die primäre OH-Gruppe des Betulins zur Aldehydgruppe oxydiert, während das sekundäre Hydroxyl noch unverändert vorhanden ist. Die Biosynthese dieser Verbindung in der vorliegenden Droge erscheint im Verlauf einer Oxydation der Methylgruppe 28 des Lupeols möglich, denn mit dem Betulin ist neben der Ausgangsstufe Lupeol auch bereits die erste Oxydationsstufe einer solchen Methylgruppenoxydation,

$$-CH_3 \longrightarrow -CH_2OH \longrightarrow -CHO \longrightarrow -COOH,$$

in dieser Pflanze nachgewiesen.

Die Annahme, daß die Verbindung e_1 mit Betulinaldehyd identisch ist, wurde durch die folgenden Punkte gefestigt: Die Verbindung e_1 schmilzt bei 190 - 192°; die Literatur führt für den Betulinaldehyd die Schmelzpunkte 192 - 193° (38) und 190 - 192° (1) auf. Die mit Hilfe der C, H-Werte der Elementaranalyse errechnete Bruttoformel der Verbindung e_1, $C_{30}H_{48}O_2$, entspricht ebenfalls dem Betulinaldehyd.

Das sekundäre Hydroxyl und die Aldehydgruppe der Verbindung e_1 konnten außer im IR-Spektrum durch die Darstellung des Acetyl-e_1-oxims nachgewiesen werden. Die C, H, N-Werte der Elementaranalyse dieses Derivats entsprechen dem Acetylbetulinaldehydoxim.

Zum endgültigen Beweis der Identität der Verbindung e_1 mit Betulinaldehyd wurde die Verbindung e_1 mit einer authentischen Probe verglichen. Die Vergleichssubstanz wurde nach einer Vorschrift von RUZICKA und REY (38) dargestellt. Dazu wurde Betulin zum Diacetat acetyliert und anschließend zum Betulin-2-monoacetat verseift. Aus dieser Substanz erhielt man durch vorsichtige Oxydation mit Chromtrioxyd in Essigsäure den Acetylbetulinaldehyd, der nach der folgenden Verseifung die Vergleichssubstanz Betulinaldehyd lieferte. Dieser Betulinaldehyd stimmte in allen geprüften Eigenschaften mit der Verbindung e_1 überein (s. Tab. 4).

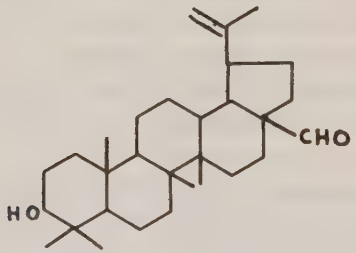


Abb. 10 Verbindung e_1
(Betulinaldehyd; 2-Hydroxy-28-oxo-$\Delta^{20:29}$lupen)

	Verbindung e_1	Betulinaldehyd
Schmp.	190 - 192°	190 - 192°
Misch-Schmp.	190 - 192°	
Schmp. des Eutektikums mit Salophen	154°	154°

Fortsetzung der Tabelle folgende Seite 41

Fortsetzung der Tabelle

	Verbindung e_1	Betulinaldehyd
Rf-Wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,70	0,70
Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure	violett	violett
Farbreaktion mit Antimon-V-Chlorid	grauviolett	grauviolett

Die IR-Spektren der beiden Verbindungen sind im Bereich 5000 - 650 cm^{-1} identisch.

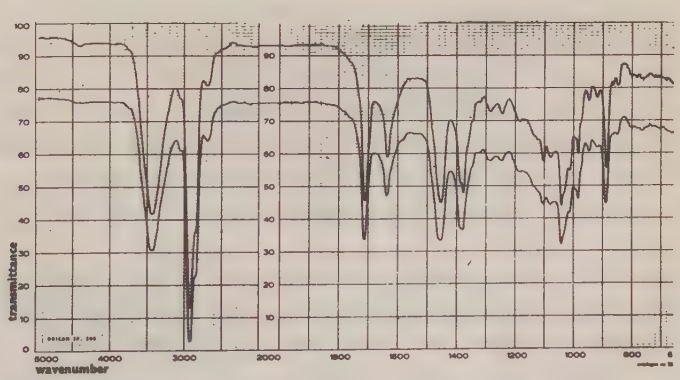


Tabelle 4 Vergleich der Verbindung e_1 mit authentischem Betulinaldehyd

d) Identifizierung der Verbindung e_2

Die Auswertung des IR-Spektrums der Verbindung e_2 ergab, daß sich das Kohlenstoffgerüst dieser Verbindung von dem der bisher identifizierten Verbindungen unterscheidet:
Im Gegensatz zu den Verbindungen c, d, e_1 sowie der Vergleichssubstanz Betulin ist die Verbindung e_2 kein asymmetrisch disubstituiertes Olefin, $R_1R_2C{=}CH_2$. In Verbindungen dieses Typs (c, d, e_1, Betulin) liegt bei bei 885 - 895 cm^{-1} eine Waggingschwingung, die zum Beweis der Anwesenheit eines solchen Äthylengliedes in den oben erwähnten Verbindungen herangezogen wurde. Im IR-Spektrum der Verbindung e_2 scheint diese Bande nach 800 cm^{-1} verschoben zu sein. Da in diesem Bereich (BELLAMY (3) : 800 - 840 cm^{-1}) die Waggingschwingungen trisubstituierter Olefine, $R_1R_2C{=}CR_3H$, liegen und die Verbindung e_2 durch eine positive Tetranitromethanprobe als Olefin identifiziert worden war, wurde angenommen, daß e_2 ein trisubstituiertes Äthylenglied enthält.

HIRSCHMANN (18) hat diese erwähnte Bande bei 800 cm^{-1} bei einer großen Anzahl von Sterolen gefunden. Da diese Stoffgruppe mit Chlorsulfonsäure ebenfalls positiv reagiert und im IR-Spektrum der Verbindung e_2 Absorptionen auftreten, die für sekundäre OH-Gruppen typisch sind, wurde geprüft, ob die Verbindung eventuell ein Sterol ist.

Eines der häufigsten Pflanzensterole ist das ß-Sitosterin mit der Bruttoformel $C_{29}H_{50}O$. Da die Ergebnisse der Elementaranalyse der Verbindung e_2 dieser Bruttoformel entsprachen, wurde vermutet, daß die Verbindung e_2 mit ß-Sitosterin identisch ist. Durch den Vergleich der e_2-Daten mit denen, die in der Literatur für ß-Sitosterin aufgeführt sind, wurde diese Annahme gefestigt:

Für ß-Sitosterin werden Schmelzpunkte von 136 - 137° (31), 137° (21) und 140° (11) angegeben; die Verbindung e_2 schmilzt bei einer Temperatur von 138 - 139°. Der Schmelzpunkt des ß-Sitosterin-3,5-dinitrobenzoats wird bei 202 - 203° angegeben, das e_2-3,5-Dinitrobenzoat

schmilzt bei 204 - 205°. Die C, H, N-Werte der Elementaranalyse dieses Derivats entsprechen dem ß-Sitosterin-3,5-dinitrobenzoat.

Die Identität der Verbindung e_2 mit ß-Sitosterin wurde durch Vergleich mit einer authentischen Probe (Handelsware der Firma C. ROTH, Karlsruhe) bewiesen. Die Vergleichssubstanz stimmte in allen geprüften Eigenschaften mit der Verbindung e_2 überein (s. Tab. 5). Damit war die Konstitution der Verbindung e_2 geklärt:

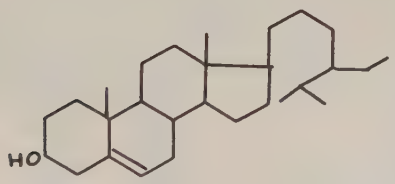


Abb. 11 Verbindung e_2
(ß-Sitosterin; 22,23-Dihydrostigmasterol)

	Verbindung e_2	ß-Sitosterin
Schmp.	138 - 139°	140°
Mischschmp.	138 - 139°	
Schmp. des Eutektikums mit Phenacetin	119°	119°
Rf-Wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,60	0,60
Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure	rotviolett m. blauem Rand	rotviolett m. blauem Rand

Fortsetzung der Tabelle folgende Seite

Fortsetzung der Tabelle

	Verbindung e_2	ß-Sitosterin
Farbreaktion mit Antimon-V-chlorid	grauviolett	grauviolett

Die IR-Spektren der beiden Verbindungen sind im Bereich 5000 - 650 cm^{-1} identisch

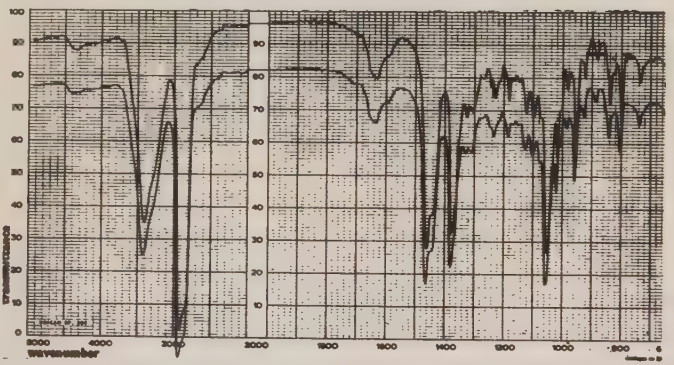


Tabelle 5 Vergleich der Verbindung e_2 mit authentischem ß-Sitosterin

e) Identifizierung der Verbindung B

Der chromatographische Vergleich der Verbindung B mit der Vergleichssubstanz Betulin im System Kieselgel G-Chloroform ergab, daß die beiden Verbindungen den gleichen Rf-Wert und durch die Detektion die gleiche Farbe grau besaßen. Da auch der Schmelzpunkt, die C, H-Werte der Elementaranalyse und das IR-Spektrum der Verbindung B dem Betulin entsprachen, wurde vermutet, daß die Verbindung B der bereits bekannte Bestandteil der Birkenrinde, Betulin, ist.

Die Identität der Verbindung B mit Betulin wurde durch den Vergleich mit einer authentischen Probe bewiesen. Die Verbindung B stimmte in allen geprüften Eigenschaften mit dem authentischen Betulin überein (s. Tab. 6).

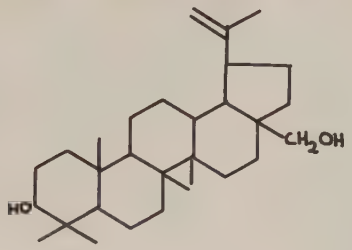


Abb. 12 Verbindung B
(Betulin; 2,28-Dihydroxy- $\Delta^{20:29}$lupen)

	Verbindung B	Betulin
Schmp.	253 - 255°	253 - 255°
Misch-Schmp.	253 - 255°	
Schmp. des Eutektikums mit Saccharin	204°	204°
Rf-Wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,50	0,50
Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure	grau	grau
Farbreaktion mit Antimon-V-chlorid	gelbbraun	gelbbraun

Fortsetzung der Tabelle folgende Seite

Fortsetzung der Tabelle

Die IR-Spektren der beiden Verbindungen B und Betulin sind im Bereich 5000 - 650 cm^{-1} identisch

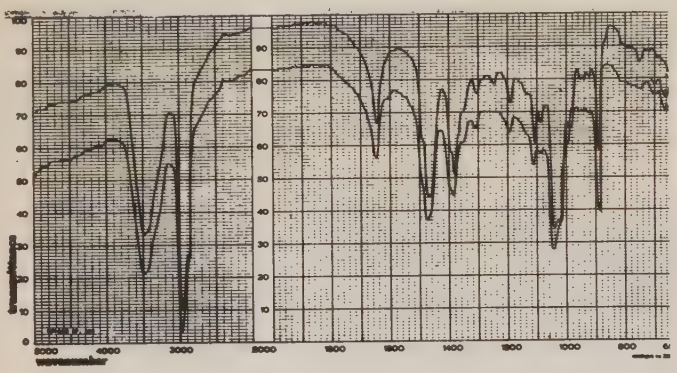


Tabelle 6 Vergleich der Verbindung B mit authentischem Betulin

f) Identifizierung der Verbindung f

Der chromatographische Vergleich der Verbindung f mit einer Probe der Vergleichssubstanz Acetyloleanolsäure im System Kieselgel G-Chloroform ergab, daß die beiden Verbindungen den gleichen Rf-Wert und durch die Detektion die gleiche Farbe violett besaßen. Es wurde daher vermutet, daß die Verbindung f mit der bereits von RUZICKA, FRAME, LEICESTER, LIGUORI und BRUNGGER (35) in der Droge nachgewiesenen Acetyloleanolsäure identisch ist. Diese Annahme wurde durch die folgenden Untersuchungen gefestigt:

Die Verbindung f schmilzt bei 256 - 258°; in der Literatur (21) wird für Acetyloleanolsäure der Schmelzpunkt 257 - 258° angegeben. Die C, H-Werte der Elementaranalyse der Verbindung f entsprechen der Bruttoformel der Acetyloleanolsäure. Der f-Methylester, der zum Beweis der Carboxylgruppe dargestellt wurde, schmilzt

bei 217 - 220°; die Literatur (12) gibt für den Acetyloleanolsäuremethylester den Schmelzpunkt 219 - 220° an. Auf Grund der Elementaranalyse wurde für den dargestellten Ester die Bruttoformel $C_{33}H_{52}O_4$ errechnet, die dem Acetyloleanolsäuremethylester entspricht.

Zum Beweis der Identität der Verbindung f mit Acetyloleanolsäure wurde die Verbindung f mit einer authentischen Probe verglichen. Zur Darstellung der Vergleichssubstanz wurde Oleanolsäure, die vorher aus den Blättern von Viscum album nach einer Vorschrift von WINTERSTEIN und HÄMMERLE (51) isoliert worden war, acetyliert. Die Verbindung f stimmte in allen geprüften Eigenschaften mit der authentischen Acetyloleanolsäure überein (s. Tab. 7). Damit war die Konstitution der Verbindung f bewiesen:

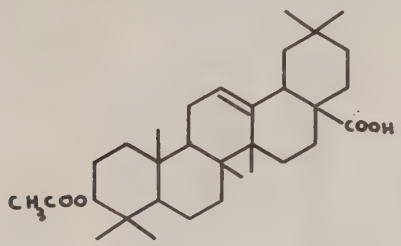


Abb. 13 Verbindung f
(2-Acetyl-$\Delta^{12:13}$-28-oleanensäure)

	Verbindg. f	Acetyloleanolsäure
Schmp.	256 - 258°	256 - 258°
Misch-Schmp.	256 - 258°	
Schmp. des Eutektikums Methylester/Saccharin	200°	200°
Rf-Wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,35	0,35

Fortsetzung der Tabelle folgende Seite

Fortsetzung der Tabelle

	Verbindung f	Acetyloleanolsäure
Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure	violett	violett
Farbreaktion mit Antimon-V-chlorid	violett ⟶ blauviolett	violett ⟶ blauviolett

Die IR-Spektren der beiden Verbindungen sind im Bereich 5000 - 650 cm^{-1} identisch:

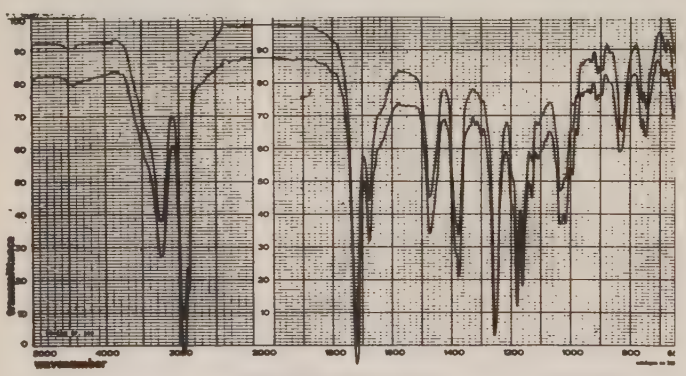


Tabelle 7 Vergleich der Verbindung f mit authentischer Acetyloleanolsäure

g) Identifizierung der Verbindung g_2

Beim Vergleich der IR-Spektren der Verbindungen Betulin und g_2 wurden folgende Unterschiede festgestellt:

Im IR-Spektrum der Verbindung g_2 fehlt die Absorption, die im Spektrum der Vergleichssubstanz Betulin für die primäre OH-Gruppe typisch ist. Dafür

sind jedoch neue Banden vorhanden, die einer Carbonylgruppe zugeordnet werden konnten. In den übrigen Bereichen sind die beiden Spektren identisch.

Auf Grund dieser Auswertung der beiden Spektren wurde vermutet, daß die Verbindung g_2 ein Triterpen der Lupeolgruppe ist, das neben einem sekundären Hydroxyl eine Carboxylgruppe besitzt. Mit dem Betulin und dem Betulinaldehyd sind in der Rinde von Betula pendula bereits zwei Verbindungen nachgewiesen worden, die aus dem Stammvertreter Lupeol im Rahmen einer fortlaufenden Methylgruppenoxydation am C-28 entstanden sind. Die in der Verbindung g_2 nachgewiesene Carbonylfunktion war Anlaß für die Annahme, daß die Verbindung g_2 eventuell mit dem möglichen vierten Glied dieser Oxydationsfolge, der Betulinsäure, identisch ist. Diese Vermutung wurde durch den Vergleich der g_2-Daten mit den in der Literatur für Betulinsäure aufgeführten Charakteristika gestützt:

Die Verbindung g_2 zersetzt sich bei der Bestimmung des Schmelzpunktes bei einer Temperatur von über 300°; die Hauptmasse schmilzt im Intervall 308 - 311°. In der Literatur werden für die Betulinsäure ähnliche Schmelzpunkte, z.T. auch Zersetzungspunkte angegeben: 298 - 300° (31), 313,5 - 316,5° (17) und 316 - 320° (Zersetzungspunkt) (21). Der aus der Verbindung g_2 dargestellte Methylester schmilzt bei 220 - 223°; die Literatur (31) führt für den Betulinsäuremethylester den Schmelzpunkt 220 - 222° an. Die Elementaranalysen der Verbindungen g_2 und g_2-Monoacetat lieferten C, H-Werte, die der Betulinsäure bzw. der Acetylbetulinsäure entsprechen.

Zum endgültigen Beweis der Identität der Verbindungen g_2 und Betulinsäure wurde erstere mit einer authentischen Probe der Betulinsäure verglichen. Die Vergleichssubstanz wurde nach einer Vorschrift von RUZICKA und LAMBERTON (37) dargestellt. Dazu wurde Betulin-3-acetat mit Chromtrioxyd in Eisessig zur Acetylbetulinsäure oxydiert, die anschließend zur Betulinsäure verseift wurde. Diese

Betulinsäure stimmte in allen geprüften Eigenschaften mit der Verbindung g_2 überein (s. Tab. 8). Damit war die Konstitution der Verbindung g_2 bewiesen:

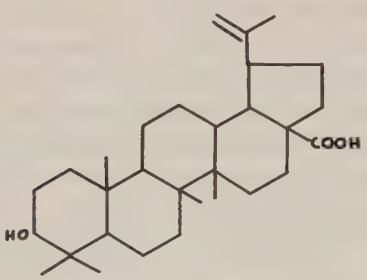


Abb. 14 Verbindung g_2
(Betulinsäure; 2-Hydroxy-$\Delta^{20:29}$-28-lupensäure)

	Verbindung g_2	Betulinsäure
Schmp.	308 - 311°	308 - 311°
Misch-Schmp.	308 - 311°	
Schmp. des Eutektikums mit Oleanolsäure	273°	273°
Rf-Wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,23	0,23
Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure	graubraun	graubraun
Farbreaktion mit Antimon-V-chlorid	gelb	gelb

Fortsetzung der Tabelle folgende Seite

Fortsetzung der Tabelle

Die IR-Spektren der Verbindungen g_2 und Betulinsäure sind im Bereich 5000 – 650 cm^{-1} identisch.

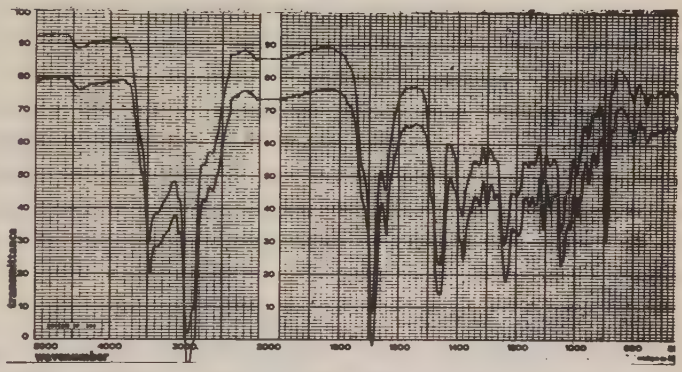


Tabelle 8 Vergleich der Verbindung g_2 mit authentischer Betulinsäure

h) Identifizierung der Substanz H

Die Fraktion H lieferte nach dem Entfernen des Lösungsmittels nur eine geringe Menge Verdampfungsrückstand. Der darin enthaltene Triterpenanteil war mit braunen, harzigen Bestandteilen verunreinigt, die auch durch wiederholtes Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln nicht entfernt werden konnten. Bei diesen Umkristallisationen zeigte der Triterpenanteil stets eine äußerst geringe Neigung zur Kristallisation, da die braunen Begleitsubstanzen offensichtlich als ausgezeichnete Lösungsvermittler wirkten. -

Aus den Versuchen, den Verdampfungsrückstand der Fraktion H in eine reine, einheitliche Substanz zu überführen, resultierte somit lediglich eine geringe Menge eines uneinheitlichen, leicht bräunlichen

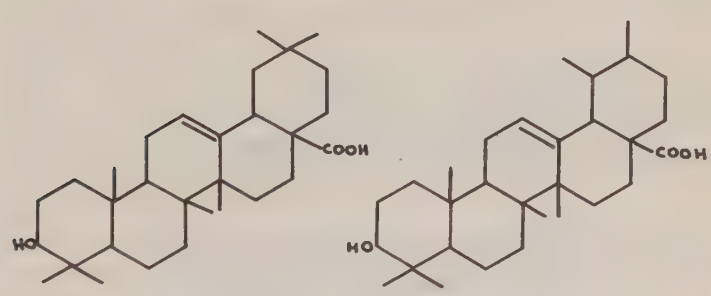
Kristallisats. Seine Identifizierung erfolgte auf chromatographischem Wege:

Der Rf-Wert der Substanz H im System Kieselgel G - Chloroform (s. Abb. 16) liegt in einem Bereich, der etwa für Hydroxymonocarbonsäuren der pentacyclischen Triterpene charakteristisch ist. Während Betulinsäure mit 0,23 noch einen etwas höheren Rf-Wert besitzt, weist eine Vergleichsprobe Oleanolsäure in diesem System mit 0,15 den gleichen Rf-Wert und bei der Detektion mit Chlorsulfonsäure oder Antimon-V-chlorid die gleichen Farben wie die Substanz H auf. Da sich die Substanz H und Oleanolsäure auch in drei weiteren Dünnschichtsystemen identisch verhielten, wurde vermutet, daß eventuell der Triterpenanteil der Substanz H aus Oleanolsäure besteht. Einschränkend mußten jedoch folgende Tatsachen berücksichtigt werden:

TSCHESCHE, LAMBERT und SNATZKE (46) war es bei früheren Untersuchungen mit Triterpensäuren nicht gelungen, die isomeren Verbindungen Betulinsäure, Oleanolsäure und Ursolsäure dünnschichtchromatographisch zu trennen. Ich konnte zwar im System Kieselgel G-Chloroform Oleanolsäure und Betulinsäure voneinander trennen, eine dünnschichtchromatographische Trennung von Oleanolsäure und Ursolsäure gelang jedoch auch mit meinen Laufmitteln nicht.

Nach den Ergebnissen der bisherigen dünnschichtchromatographischen Untersuchungen konnte der Triterpenanteil der Substanz H somit nicht nur Oleanolsäure, sondern auch Ursolsäure oder eine Mischung der beiden Verbindungen sein. Diese Frage wurde mit Hilfe der Papierchromatographie (46) geklärt, indem die Substanz H mit Oleanolsäure und Ursolsäure (die Vergleichsprobe Ursolsäure wurde nach einer Vorschrift von BRIESKORN und SCHLUMPRECHT (29) aus Salvia officinalis isoliert) in zwei Systemen chromatographisch verglichen wurde, in denen diese beiden Vergleichssubstanzen jeweils einen

verschiedenen Rf-Wert besitzen. In beiden Systemen zeigte die Substanz H je zwei Flecken, die eindeutig Oleanolsäure und Ursolsäure zugeordnet werden konnten. Bei dieser chromatographischen Identifizierung erwiesen sich die unterschiedlichen Farben der beiden Verbindungen auf dem Chromatogramm, durch die Detektion mit Antimon-V-chlorid hervorgerufen, als ein gutes Unterscheidungsmerkmal. Oleanolsäure färbt sich mit diesem Reagenz rötlich, Ursolsäure dagegen charakteristisch blau. Die Daten dieser Identifizierung der Substanz H sind in der Tabelle 9 zusammengefaßt. Abbildung 11 zeigt die Formeln der in der Substanz H nachgewiesenen Triterpene.



Oleanolsäure Ursolsäure

Abb. 15 Triterpene der Substanz H

	Substanz H	Oleanolsäure	Ursolsäure
Rf-Wert im System I	0,15	0,15	0,15
Rf-Wert im System II	0,53	0,53	0,53
Rf-Wert im System III	0,44	0,44	0,44
Rf-Wert im System IV	0,64	0,64	0,64
Rf-Wert im System V	0,48 0,64	0,64	0,48
Rf-Wert im System VI+)	0,43 0,81	0,81	0,43

System I: Kieselgel G, Chloroform
System II: Kieselgel G, Chloroform-Aceton (10 : 1)
System III: Aluminiumoxyd G, Cyclohexan-Chloroform (7 : 3), mit 99 proz. Ameisensäure gesättigt
System IV: Aluminiumoxyd G, Äthylmethylketon, mit 1,5 proz. Ammoniaklösung gesättigt
System V: Anionenaustauschpapier, Cyclohexan-Toluol (6 : 4), mit 99 proz. Ameisensäure gesättigt
System VI: Papier 2043 bM mit Formamid imprägniert, Cyclohexan-Essigester (19 : 1), mit Formamid gesättigt

Tabelle 9 Chromatographischer Vergleich der Triterpene der Substanz H mit Oleanolsäure und Ursolsäure

+) Die Flecke schwänzen in diesem System; die Rf-Werte sind auf ihre Mittelpunkte bezogen.

B) Untersuchung der Triterpenführung der Rinde von Betula pubescens

Die Untersuchung der Triterpenführung dieser Droge wurde mit den gleichen Methoden durchgeführt, die bei der Untersuchung der Rinde von Betula pendula erarbeitet worden waren. Da der Analysengang bereits ausführlich bei der Prüfung des Materials der Hängebirke beschrieben worden ist, wird im folgenden Abschnitt auf diesen Arbeitsteil nicht mehr näher eingegangen. Die Ergebnisse der Untersuchung der Droge von Betula pubescens werden nur kurz beschrieben und mit denen von Betula pendula verglichen.

1.) Qualitativer Nachweis der Triterpene

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurden im System Kieselgel G-Chloroform in der Droge von Betula pubescens genau wie in der Rinde von Betula pendula acht Substanzen nachgewiesen, die mit Chlorsulfonsäure positiv reagierten.

Anschließend wurden die in den beiden Drogen nachgewiesenen Substanzen dünnschichtchromatographisch miteinander verglichen. Dieser Vergleich ergab, daß die Rinden von Betula pendula und Betula pubescens in dem verwendeten System keine Unterschiede in Bezug auf ihre Triterpenführung aufwiesen. Bei dieser Untersuchung wurden neben den Rf-Werten auch die Farben verglichen, die die Flecken auf dem Chromatogramm nach Behandlung mit Chlorsulfonsäure besaßen (siehe Abbildung 16).

Dieser erste Vergleich legte bereitsdie Vermutung nahe, daß die Triterpenführung der beiden Rinden in dem untersuchten Bereich wenigstens qualitativ übereinstimmt. Der eindeutige Beweis dieser Vermutung sollte anschließend erbracht werden, indem die in der Droge

von Betula pubescens nachgewiesenen Verbindungen ebenfalls isoliert und dann die kristallinen, reinen Substanzen mit denen von Betula pendula verglichen wurden.

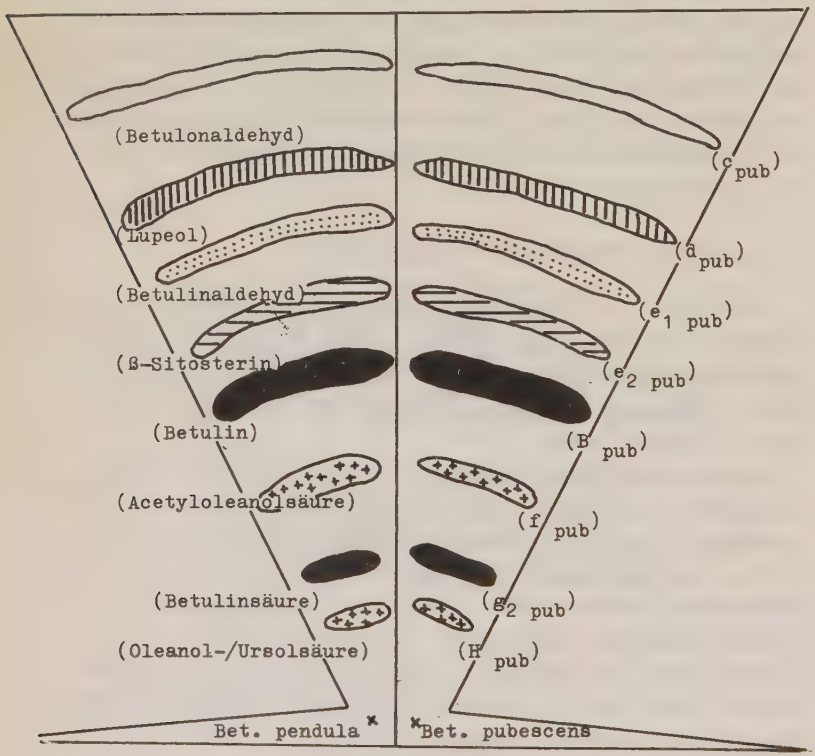


Abb. 16 Vergleich der in den Rinden von Betula pendula und Betula pubescens nachgewiesenen Verbindungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie im System Kieselgel G-Chloroform

2.) Isolierung der Triterpene

Zur Isolierung der dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen Verbindungen wurde die Droge in der für das Material von Betula pendula beschriebenen Weise aufgearbeitet.

Die Extraktion der Droge ergab im Vergleich zu der von Betula pendula geringere Mengen Trockenextrakte. Während 250 g Rinde von Betula pendula etwa 12 g Rohbetulin und ca. 4 g Verdampfungsrückstand der Mutterlauge geliefert hatten, wurden aus der gleichen Menge Material von Betula pubescens nur etwa 8 g Rohbetulin und ca. 2 g Rückstand der Mutterlauge (=$E._{pub}$) extrahiert. Dieser Verdampfungsrückstand der Mutterlauge, $E._{pub}$, wurde wie bei $E._{pen}$ beschrieben nacheinander an 2 verschiedenen Säulen chromatographiert. Die erste Fraktion der Säule I enthielt eine äußerst geringe Menge der Substanz c_{pub}, die zwar chromatographisch nachgewiesen werden konnte, aber nicht kristallin erhalten wurde. Aus den folgenden mittleren Fraktionen wurden etwa 900 mg der Verbindung d_{pub} (ca. 0,180 %) vom Schmelzpunkt 212 - 215°, 120 mg der Verbindung $e_{1\ pub}$ (ca. 0,024 %) vom Schmelzpunkt 190 - 192° und ca. 110 mg der Verbindung $e_{2\ pub}$ (ca. 0,022 %) vom Schmelzpunkt 138 - 139° isoliert. Das weitere Eluat enthielt die Verbindung B_{pub} vom Schmelzpunkt 253 - 255° und die Substanz n_{pub}. Der Vorlauf der Säule II lieferte einen Rest der Verbindung B_{pub}, so daß zusammen (Säule I und II) etwa 1,800 g (ca. 0,360 %) dieser Substanz isoliert wurden. Die nächst folgenden Fraktionen dieser Säule lieferten 55 mg der Verbindung f_{pub} (ca. 0,011 %) vom Schmelzpunkt 256 - 258°, etwa 95 mg der Verbindung $g_{2\ pub}$ (ca. 0,019 %) vom Schmelzpunkt 308 - 311° und wenig einer unreinen Substanz H_{pub}. Der Nachlauf enthielt wie bei Betula pendula eine geringe Menge einer braunen, harzigen Masse, die auch hier nicht näher untersucht wurde. Die schematisch darge-

stellte Aufarbeitung der Rinde von Betula pendula auf Seite 32 gilt entsprechend auch für die Aufarbeitung dieser Droge.

3.) Identifizierung der isolierten Verbindungen

Ein erster chromatographischer Vergleich der aus den beiden Betula-Arten isolierten Substanzen hatte bereits ergeben, daß auf dem Chromatogramm (siehe Seite 56, Abb. 16) jeder Substanz aus der Rinde von Betula pendula auf Grund gleicher Rf-Werte und gleicher Farben eine Substanz aus der Rinde von Betula pubescens zugeordnet werden konnte. Hieraus war die Annahme abgeleitet worden, daß die Triterpenführung der beiden Rinden im untersuchten Bereich übereinstimmt. Die aus Betula pubescens isolierten Verbindungen wurden daher zur Identifizierung mit den ihnen jeweils entsprechenden Verbindungen aus der Rinde von Betula pendula verglichen.

a) Identifizierung des Triterpens aus der Fraktion c_{pub}

Die betreffende Säulenfraktion enthielt neben einer sehr geringen Menge der Substanz c_{pub} noch gelbe, ölige Bestandteile. Es gelang daher nicht, die Verbindung zu kristallisieren. Der Beweis der Identität mit Betulonaldehyd wurde auf chromatographischem Wege erbracht. Die Verbindung c_{pub} wurde in drei Systemen mit einer Probe Betulonaldehyd aus der Rinde von Betula pendula verglichen. Die authentische Probe verhielt sich in allen drei Systemen wie die Verbindung c_{pub} (siehe Tabelle 10). Damit war auch in der Droge von Betula pubescens Betulonaldehyd nachgewiesen.

	Verbindg. c_{pub}	Betulonaldehyd
Rf-Wert im System Kieselgel G, Chloroform	0,92	0,92
Rf-Wert im System Aluminiumoxyd G, Cyclohexan-Aceton (4 : 1)	0,90	0,90
Rf-Wert im System Papier Nr. 2043 a"hy", Methanol-Aceton (49 : 1)	0,85	0,85
Detektion mit Chlorsulfonsäure	braun	braun
Detektion mit Antimon-V-chlorid	gelb	gelb

Tabelle 10 Vergleich der Verbindung c_{pub} mit authentischem Betulonaldehyd

b) Identifizierung der Verbindung d_{pub}

Die Identifizierung der Verbindung d_{pub} als Lupeol erfolgte durch den Vergleich mit einer authentischen Probe aus der Droge von Betula pendula:

Die beiden Verbindungen besitzen auf dem Dünnschichtchromatogramm (s. Abb. 16) den gleichen Rf-Wert, 0,77, und durch die Behandlung mit Chlorsulfonsäure die gleiche Farbe rot-braun. Sie schmelzen beide bei 212 - 215°; im gleichen Intervall liegt auch der Mischschmelzpunkt der beiden Substanzen. Die Eutektika der Verbindungen d_{pub} und Lupeol mit Saccharin besitzen mit jeweils 196° den gleichen Schmelzpunkt. Das IR-Spektrum der Verbindung d_{pub} ist mit dem des Lupeols im Bereich 650 - 5000 cm^{-1} identisch.

c) Identifizierung der Verbindung $e_{1\ pub}$

Die Identität dieser Verbindung mit Betulinaldehyd wurde durch den Vergleich mit einer authentischen Probe aus der Rinde von Betula pendula bewiesen:

Auf dem Dünnschichtchromatogramm (s. Abb. 16) besitzen sowohl die Verbindung $e_{1\ pub}$ als auch Betulinaldehyd den Rf-Wert 0,70; durch die Detektion sind beide Flecken violett gefärbt. Die Schmelzpunkte und der Mischschmelzpunkt der beiden Verbindungen liegen bei der gleichen Temperatur von 190 - 192°. Bei 154° liegt der Schmelzpunkt des Eutektikums der Verbindung $e_{1\ pub}$ mit Salophen, das Eutektikum Betulinaldehyd/Salophen weist die gleiche Konstante auf. Die IR-Spektren der Verbindungen $e_{1\ pub}$ und Betulinaldehyd sind im Bereich 650 - 5000 cm^{-1} identisch.

d) Identifizierung der Verbindung $e_{2\ pub}$

Die Verbindung aus der Droge von Betula pendula, die der Verbindung $e_{2\ pub}$ auf dem Dünnschichtchromatogramm entspricht, ist das ß-Sitosterin (s. Abb. 16). Zur Bestätigung der Vermutung, daß auch diese beiden Verbindungen identisch sind, wurden ihre Eigenschaften verglichen:

Beide Verbindungen besitzen auf dem Chromatogramm den Rf-Wert 0,6 und färbten sich bei der Detektion mit Chlorsulfonsäure rotviolett. ß-Sitosterin und die Verbindung $e_{2\ pub}$ schmelzen bei der gleichen Temperatur von 138 - 139°, beim Mischschmelzpunkt wird diese Temperatur nicht erniedrigt. Die Eutektika der beiden Verbindungen mit Phenacetin besitzen den gleichen Schmelzpunkt von 119°. Die IR-Spektren der Verbindung $e_{2\ pub}$ und des ß-Sitosterins sind im Bereich 650 - 5000 cm^{-1} identisch.

Da die Verbindung $e_{2\ pub}$ mit ß-Sitosterin in sämtlichen geprüften Eigenschaften übereinstimmte, ist bewiesen, daß ß-Sitosterin auch Bestandteil der Rinde von Betula pubescens ist.

e) Identifizierung der Verbindung B_{pub}

Die Verbindung B_{pub} wurde als Betulin identifiziert, da sie in allen geprüften Eigenschaften mit dem authentischen Betulin aus der Droge von Betula pendula übereinstimmte:

Die Verbindungen B_{pub} und Betulin besitzen auf dem Chromatogramm (s. Abb. 16) den gleichen Rf-Wert 0,5 und durch die Behandlung mit Chlorsulfonsäure die gleiche Farbe grau. Erfolgte die Detektion mit Antimon-V-chlorid, so färbten sich beide Verbindungen gelbbraun. Die Verbindung B_{pub} schmilzt bei der gleichen Temperatur wie das authentische Betulin, der Mischschmelzpunkt der beiden Substanzen liegt ebenfalls im Intervall von 253 - 255°. Das Eutektikum der Verbindung B_{pub} mit Saccharin besitzt mit 204° den gleichen Schmelzpunkt wie das Eutektikum Betulin/Saccharin. Das IR-Spektrum der Verbindung B_{pub} ist mit dem des Betulins im Bereich 650 - 5000 cm^{-1} identisch.

f) Identifizierung der Verbindung f_{pub}

Die Verbindung f_{pub} wurde zur Identifizierung mit einer Probe der authentischen Acetyloleanolsäure aus der Rinde von Betula pendula verglichen:

Auf dem Chromatogramm (s. Abb. 16) besitzt die Verbindung f_{pub} wie die authentische Acetyloleanolsäure den Rf-Wert 0,35; durch die Detektion mit Chlorsulfonsäure sind beide Verbindungen violett gefärbt. Acetyloleanolsäure und die Verbindung f_{pub} schmelzen bei 256 - 258°, beim Mischschmelzpunkt wird diese Temperatur nicht erniedrigt. Das IR-Spektrum der Verbindung f_{pub} ist im Bereich 650 - 5000 cm^{-1} mit dem der Acetyloleanolsäure identisch. Außer diesen aufgeführten Daten stimmten auch die Konstanten der dargestellten Methylester der beiden Verbindungen überein. So wurde für beide Schmelzpunkte und den Mischschmelzpunkt dieser Derivate die gleiche Temperatur von 217 - 220° gemessen.

Die Eutektika dieser beiden Methylester mit Saccharin wiesen mit 200° ebenfalls einen gleichen Schmelzpunkt auf.

Durch diese Übereinstimmung der Eigenschaften der Verbindung f_{pub} und Acetyloleanolsäure ist die Identität der beiden Verbindungen bewiesen.

g) Identifizierung der Verbindung $g_{2\ pub}$

Auf dem Chromatogramm (s. Abb. 16) entspricht der Verbindung $g_{2\ pub}$ die Betulinsäure aus der Droge von Betula pendula. Die beiden Verbindungen besitzen dort den gleichen Rf-Wert 0,23 und die gleiche Farbe grau. Erfolgte die Detektion mit Antimon-V-chlorid, so färbten sich beide Verbindungen gelb. Für die Schmelzpunkte und den Mischschmelzpunkt der Verbindungen wurde die gleiche Temperatur von 308 - 311° gemessen. Die Eutektika $g_{2\ pub}$/Oleanolsäure und Betulinsäure/Oleanolsäure besitzen den gleichen Schmelzpunkt von 273°. Das IR-Spektrum der Verbindung $g_{2\ pub}$ ist mit dem der Betulinsäure im Bereich 650 - 5000 cm^{-1} identisch.

Da die Verbindungen $g_{2\ pub}$ und Betulinsäure in sämtlichen geprüften Eigenschaften übereinstimmten, ist ihre Identität bewiesen.

h) Identifizierung der Substanz H_{pub}

Die geringe Menge des mit braunen, harzigen Bestandteilen verunreinigten Triterpenanteils der Fraktion H_{pub} wurde identifiziert, indem sie mit dem Oleanol- - Ursolsäure-Gemisch aus der Droge von Betula pendula chromatographisch verglichen wurde. Für diesen Vergleich wurden die Chromatographie-Systeme benutzt, die auch bei der Identifizierung der Substanz H angewendet worden waren. Neben den Rf-Werten wurden wiederum die Farben verglichen, die die Verbindungen auf den Chromatogrammen nach der Behandlung mit Antimon-V-chlorid aufwiesen. Die Ergebnisse dieses Vergleichs zeigten, daß die Substanzen H und H_{pub} die gleichen Triterpene, Oleanol- und Ursol-

säure, enthielten (s. folgende Tabelle 11).

	Verbindung H_{pub}	Ursolsäure-Oleanolsäure
Rf-Wert im System I	0,15	0,15
Rf-Wert im System II	0,53	0,53
Rf-Wert im System III	0,44	0,44
Rf-Wert im System IV	0,64	0,64
Rf-Wert im System V	0,48 0,64	0,48 0,64
Rf-Wert im System VI	0,43 0,81	0,43 0,81

System I: Kieselgel G, Chloroform
System II: Kieselgel G, Chloroform-Aceton (10 : 1)
System III: Aluminiumoxyd G, Cyclohexan-Chloroform (7 : 3), mit 99 proz. Ameisensäure gesättigt
System IV: Aluminiumoxyd G, Athylmethylketon, mit 1,5 proz. Ammoniaklösung gesättigt
System V: Anionenaustauschpapier, Cyclohexan-Toluol (6 : 4), mit 99 proz. Ameisensäure gesättigt
System VI: Papier 2043 bM mit Formamid imprägniert, Cyclohexan-Essigester (19 : 1), mit Formamid gesättigt

Tabelle 11 Chromatographischer Vergleich der Triterpene der Substanz H_{pub} mit einem Ursol- - Oleanolsäure-Gemisch (Substanz H) aus der Rinde von Betula pendula

VI Diskussion

In den Rinden von Betula pendula und Betula pubescens wurden je die gleichen neun Verbindungen, acht Triterpene und ein Sterin, nachgewiesen. Auf Grund dieser bemerkenswerten Übereinstimmung der Triterpenführung in den beiden Arten läßt sich die in der Einleitung aufgeworfene Frage nach der Stellung von Betula carpatica im Rahmen dieser Untersuchung nicht beantworten. Möglicherweise führt die Analyse anderer Pflanzenteile und anderer Stoffgruppen zu günstigeren Voraussetzungen für eine Lösung dieses Problems.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung werfen die Frage auf, ob diese Konstanz der Triterpenführung lediglich charakteristisch für die beiden untersuchten Betula-Arten ist oder ob sie sich über eine größere botanische Einheit wie Gattung (Betula), Familie (Betulaceae) oder sogar Ordnung (Fagales) erstreckt. Nur entsprechend umfangreiche Untersuchungen könnten eine exakte Antwort geben. Erste Anhaltspunkte ergeben sich jedoch, wenn man die Triterpenführung der Arten der Fagales, deren Rinden auf das Vorkommen dieser Stoffklasse geprüft wurden, vergleicht (siehe Tabelle 12). Es zeigt sich, daß zwar Triterpene in der Ordnung verbreitet sind, die einzelnen Muster der Triterpenführung aber doch von Gattung zu Gattung und zum Teil auch von Art zu Art variieren. Besonders bemerkenswert sind die Ergebnisse von HEJNO, JAROLÍM und ŠORM (17), die aus Birken tschechoslowakischer Herkunft[+)] neben Betulin, Betulinsäure und Lupeol nicht Betulonaldehyd, Betulinaldehyd, ß-Sitosterin, Oleanolsäure und Ursolsäure, sondern Allobetulin, zwei nicht identifizierte Acetyllactone und einen Betulinester isolierten.

[+)] Die Art wurde in der Veröffentlichung nicht näher charakterisiert; sie wird in der Tabelle 12 als Betula spec. gekennzeichnet.

Betula pendula	Betula pubescens	Betula spec. (17)
Lupeol	Lupeol	Lupeol
Betulin	Betulin	Betulin
Betulinaldehyd	Betulinaldehyd	Allobetulin
Betulonaldehyd	Betulonaldehyd	Betulinester
Betulinsäure	Betulinsäure	Betulinsäure
Ac-Oleanolsäure	Ac-Oleanolsäure	Ac-Lacton I
Oleanolsäure	Oleanolsäure	Ac-Lacton II
ß-Sitosterin	ß-Sitosterin	
Ursolsäure	Ursolsäure	

Alnus barbata (26)	Alnus glutinosa	Alnus incana (40)	Alnus viridis (9)
Betulin	Lupeol (21)	Lupenon	
Betulinsäure			
Alnusenon	Alnusenon (5)	Alnincanon	Alnincanon
Taraxerol	Taraxerol (55)	Taraxerol	
	Taraxeron (55)	Taraxeron	Taraxeron
			Taraxerol-Ac

Quercus petrae (39)	Quercus robur (54)	Quercus suber
Friedelin	Friedelin	Friedelin (15)
Friedelanol	Friedelanol	
Alnusenol	Alnusenol	Cerin (45)
	Alnusenon	
	ß-Sitosterin	
	20-Hydroxydammar-24-en-3-on	

Tabelle 12 Vergleich der in Rinden von Fagales-Arten nachgewiesenen Triterpene

Ich habe meine Drogen zusätzlich auf diese Verbindungen geprüft. Nach meiner Methode hätten zum Beispiel noch 0,0016 % Allobetulin (bezogen auf trockene Droge) in den Extrakten erfaßt werden können. Es gelang mir jedoch nicht, Allobetulin oder die beiden Acetyllactone nachzuweisen; auf den Betulinester wurden die beiden Rinden nicht untersucht. - Dieser Vergleich der Betula-Arten zeigt, daß die bei Betula pendula und Betula pubescens festgestellte Konstanz der Triterpenführung bereits innerhalb der Gattung durchbrochen wird.

Vom biogenetischen Standpunkt aus ist interessant, daß sich die neun isolierten Verbindungen auf vier Grundtypen zurückführen lassen, die im Verlauf ihrer Biogenese aus der gleichen aliphatischen Vorstufe Squalen entstehen. Die Reaktionsfolge, die in den beiden Pflanzen vom Lupeol über Betulin und Betulinaldehyd zur Betulinsäure führt, ist ein klassisches Beispiel einer Methylgruppenoxydation. Jede der zu fordernden Oxydationsstufen (siehe folgende Abbildung 17) konnte als kristalline Substanz isoliert werden. Die Produkte einer analogen Reaktionsfolge (Oxydation der Methylgruppe 28) sind auch für α-Amyrin und ß-Amyrin bekannt (31). Von zwei Ausnahmen abgesehen (Oleanolaldehyd (41a), Betulinaldehyd (1)) waren bei bisherigen Untersuchungen jedoch die Aldehyde in den betreffenden Pflanzen nicht nachzuweisen. Umso bemerkenswerter ist, daß im vorliegenden Fall auch der Betulinaldehyd in beträchtlicher Menge vorkommt.

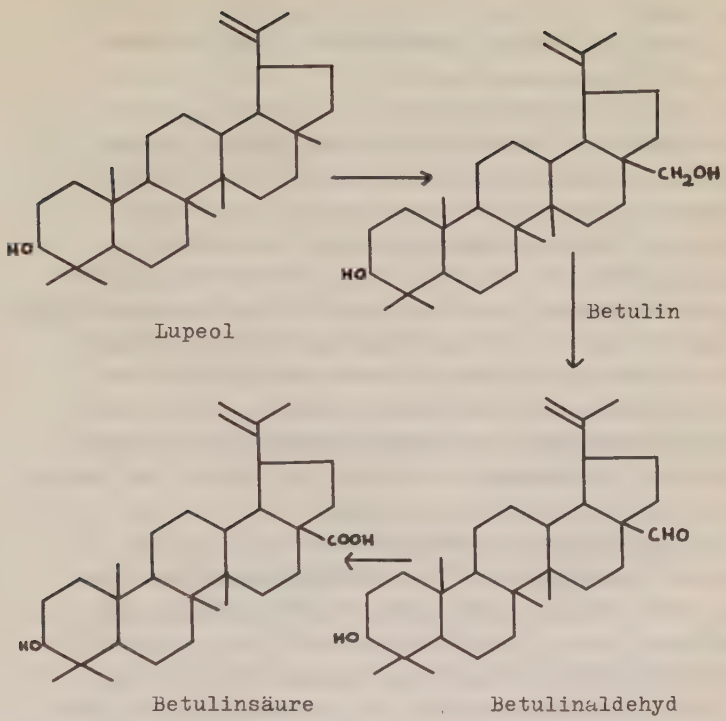


Abb. 17 Darstellung einer Methylgruppenoxydation am Beispiel der Oxydation der Methylgruppe 28 des Lupeols

VII Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Rinden von Betula pendula und Betula pubescens auf das Vorkommen freier Triterpene untersucht:

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurden im System Kieselgel G-Chloroform in den beiden Birken-Arten jeweils acht Substanzen nachgewiesen, die mit Chlorsulfonsäure positiv reagierten, also sehr wahrscheinlich Triterpene oder Steroide darstellten.

Zur präparativen Trennung dieser Verbindungen wurden die Bedingungen der Dünnschichtchromatographie leicht abgewandelt auf die Säulenchromatographie übertragen. Mittels wiederholter Adsorptionschromatographie der Cyclohexanextrakte an Kieselgel gelang es, die dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen Verbindungen voneinander zu trennen; die Substanzen wurden zum größten Teil in kristalliner Form erhalten.

Die Identifizierung erfolgte durch CH-Analysen, IR-Spektren, Schmelzpunkte, auf chromatographischem Wege sowie durch Vergleich mit authentischen Proben. Auf diese Weise wurden in den beiden Betula-Arten jeweils die gleichen neun Verbindungen nachgewiesen. Betulin und Acetyloleanolsäure waren als Bestandteile der Rinde von Betula alba L. bekannt; Lupeol, Betulinaldehyd, Betulonaldehyd, Betulinsäure, Oleanolsäure, Ursolsäure und ß-Sitosterin wurden in den beiden Arten neu gefunden[+)].

Auf Grund der Übereinstimmung der Triterpenführung in Betula pendula und Betula pubescens läßt sich die in der Einleitung aufgeworfene Frage nach der taxonomischen Stellung von Betula carpatica nicht diskutieren.

+) Vergleiche Abschnitt III, Seite 14

Experimenteller Teil

Allgemeines:

Die Rinden der beiden Betula-Arten wurden im Sommer 1963 und 1964 in Berliner Waldgebieten gesammelt. Das Material von Betula pendula stammt aus dem Tegeler Forst, das vom Betula pubescens aus dem Berliner Moor "Langes Luch". Es wurde an der Luft getrocknet und anschließend in einer Fruchtmühle zerkleinert.

Zur DC wurden Platten von 20 cm x 20 cm verwendet. Die Schichtdicke der Sorptionsmittel (Fa. MERCK) betrug ca. 300 µ . Streichgerät: nach STAHL (Fa. DESAGA).

Zur PC wurde Papier der Fa. Schleicher und Schüll verwendet. Chromatographiert wurde nach der aufsteigenden Methode.

Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Besprühen mit Chlorsulfonsäure-Reagenz, Chlorsulfonsäure-Eisessig (1 : 2), und anschließendem Erhitzen (5 Min., 130°) oder durch Besprühen mit Antimon-V-chlorid-Reagenz, eine 10 proz. Lösung von Antimon-V-chlorid in Chloroform, und anschließendem Erhitzen (5 Min., 100°).

Die Verhältnisangaben bei Laufmitteln zur Chromatographie beziehen sich auf Volumina (V/V). Es wurden nicht besonders gereinigte, handelsübliche Lösungsmittel benutzt.

Die Mikroanalysen wurden ausgeführt im Mikroanalytischen Labor A. Bernhardt, Institut für Kohleforschung, Mülheim/Ruhr.

IR-Spektren wurden mit einem Leitz Unicam SP 200 Spektrophotometer aufgenommen; es gelangten KBr-Presslinge zur Messung. Das Verhältnis Analysensubstanz/KBr betrug etwa 2 mg/200 mg.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte auf einem Heiztischmikroskop nach Kofler. Bei Substanzen, die auf diesem Gerät durch Zersetzung ein zu großes Schmelzintervall besaßen, wurden die Schmelzpunkte in zugeschmolzenen, nicht evakuierten Kapillaren im Schmelzpunktsapparat nach Roth bestimmt. Diese Schmelzpunkte sind im folgenden Text mit (zug. Kapillare) gekennzeichnet.

A) Qualitativer Nachweis der Triterpene der Rinde von Betula pendula (Betula pubescens)

20 g Droge wurde im Soxhlet mit Cyclohexan 6 Stunden extrahiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. abdestilliert und 0,01 ml einer 2,5 proz. Lösung des Rückstandes auf eine Kieselgel G-Platte aufgetragen, die nur DC nach der Keilstreifenmethode präpariert worden war. Nach dem Entwickeln mit Chloroform erfolgte die Detektion der getrennten Substanzen mit Chlorsulfonsäure. Es wurden 8 farbige Flecken sichtbar (s. Abb. 16).

B) Isolierung der Verbindungen von Betula pendula (Betula pubescens)

1.) Extraktion

250 g Droge wurden im Soxhlet mit 2 Liter Cyclohexan 10 Stunden extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. In dieser Zeit hatten sich etwa 12 g (Betula pubescens: 8 g) eines kristallinen Niederschlags gebildet, der hauptsächlich aus Betulin bestand. Der Niederschlag wurde abgesaugt und die Mutterlauge i. Vak. zur Trockne eingedampft. Es blieben 4 g (Betula pubescens: 2 g) eines kristallinen, gelblichen Rückstandes, E_{pen} (Betula pubescens: E_{pub}).

2.) Präparative Trennung der Triterpene

2.1) Trennung der Triterpene, $Rf \geq Rf_{Betulin}$, an Säule I

240 g Kieselgel H wurden als Suspension in Methylenchlorid in eine Säule (d=6 cm, h=60 cm) geschlämmt. Nach dem Absitzen wurde eine Lösung von 4 g E_{pen} (E_{pub}) in 50 ml Methylenchlorid auf das Adsorbens gebracht. Es wurde solange mit Methylenchlorid eluiert, bis der größte Teil des Betulins die Säule verlassen hatte. Dann wurde als Solvens Chloroform-Aceton (4 : 1) verwendet.

Das Eluat wurde in Anteilen von 20 ml gesammelt. Die Abtropfgeschwindigkeit betrug 1 ml/Min. Die dc einheitlichen Anteile wurden vereinigt und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Dadurch konnte das Gesamteluat in folgende Fraktionen zerlegt werden (s. Tabelle 13):

Solvens	Eluat [ml]	Fraktion	Verdampfungsrückstand [mg]
Methylenchlorid	0 - 840	öl. Substanz	-
	840 - 1120	c (c_{pub})	30 (+))
	1280 - 1920	d (d_{pub})	500 (900)
	2020 - 2140	e_1 ($e_{1\ pub}$)	80 (120)
	2300 - 2700	e_2 ($e_{2\ pub}$)	70 (110)
	3040 - 4100	B (B_{pub})	2500 (1400)
Chloroform-Aceton (4:1)	ab 4100	n (n_{pub})	500 (1050)

Tabelle 13 Trennung von 4 g Extrakt E_{pen} (E_{pub}) aus der Rinde von Betula pendula (Betula pubescens) durch Säulenchromatographie an Kieselgel H

2.2) Trennung der Triterpene, $Rf \leq Rf_{Betulin}$, an Säule II.

120 g Kieselgel H wurden in Chloroform suspendiert und in eine Säule (d=6 cm, h=60 cm) geschlämmt. Nach dem Absitzen wurde 1 g Verdampfungsrückstand der Fraktion n (n_{pub}; s. Tabelle 13) in 20 ml Chloroform gelöst und auf das Adsorbens gebracht. Eluiert wurde mit

+) nur chromatographisch nachgewiesen

Chloroform-Aceton (10 : 1). Das Eluat wurde wie oben (s. Säule I) gesammelt und eingedampft (Aufteilung in Fraktionen s. folgende Tabelle).

Solvens	Eluat [ml]	Fraktion	Verdampfungs-rückstand [mg]
Chloroform-Aceton (10:1)	0- 720	B (B_{pub})	400 (400)
	780- 920	f (f_{pub})	50 (55)
	940-1140	g_2 ($g_{2\ pub}$)	105 (95)
	1220-1380	H (H_{pub})	22 (26)
	ab 1400	wenig harzige, braune Substanz	

Tabelle 14 Trennung von 1 g Verdampfungsrückstand der Fraktion n (n_{pub}) aus der Rinde von Betula pendula (Betula pubescens) durch Säulenchromatographie an Kieselgel H

C) Identifizierung der isolierten Verbindungen

1.) Verbindung c

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion c wurde dreimal aus Äther-Methanol umkirstallisiert. Er lieferte 25 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 164 - 166° (zug. Kapillare). Der Schmelzpunkt wurde durch authentischen Betulonaldehyd (38) nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 164 - 166° (zug. Kapillare). Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Benzanilid liegt bei 126°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung c gelb: Nachweis der Äthylenbindung.

Elementaranalyse:

$C_{30}H_{46}O_2$ (438,7) Ber. C 82,13 H 10,57
Gef. C 82,28 H 10,54

Das IR-Spektrum der Verbindung c zeigt charakteristische Maxima bei 885, 1640, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C{=}CH_2$), 1718, 2700 cm^{-1} (Aldehydgruppe) und 1699 cm^{-1} (Ketogruppe).

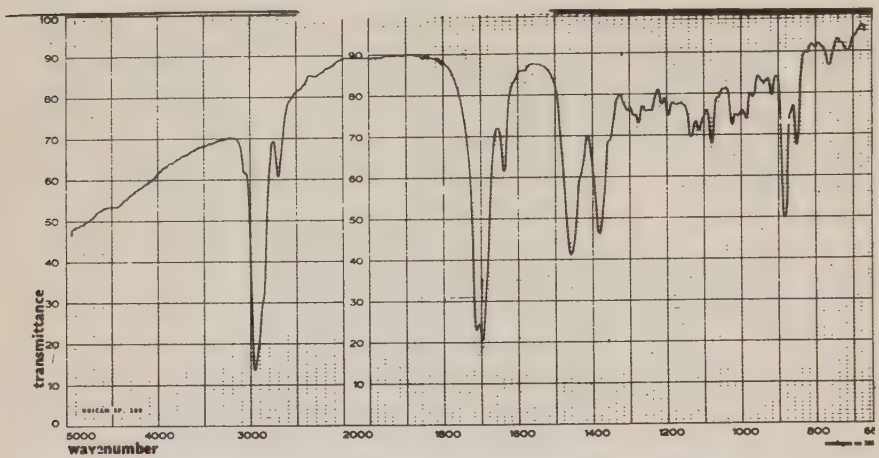


Abb. 18 IR-Spektrum der Verbindung c

Darstellung des Dioxims

60 mg der Verbindung c wurden mit 120 mg Hydroxylaminhydrochlorid und 250 mg frisch geschmolzenem Kaliumacetat 4 Stunden in 20 ml absolutem Alkohol unter Rückfluß gekocht. Hierauf engte man auf ein Drittel des Volumens ein, filtrierte vom ausgeschiedenen Kaliumchlorid ab und ließ das Reaktionsprodukt auf Zusatz von einigen Tropfen Wasser auskristallisieren. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol erhielt man das Dioxim in feinen Nadeln vom Schmelzpunkt 245 - 247° (zug. Kapillare).

Elementaranalyse:

$C_{30}H_{48}O_2N_2$	(468,7)	Ber.	C 76,87	H 10,32	N 5,98
		Gef.	C 77,11	H 10,18	N 5,89

2.) Verbindung c_{pub}

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion c_{pub} bestand aus einem gelben, zäh-öligen Produkt, das nacheinander

in Äther-Methanol, Methanol, Äthanol-Wasser und Hexan gelöst wurde. Auch nach längerem Stehen schieden sich aus keinem der Lösungsmittel Kristalle ab. Mit Hilfe der DC wurde im System Kieselgel G-Chloroform die Verbindung c_{pub} vom Rf-Wert 0,92 (Rf-Wert der Vergleichssubstanz Betulin: 0,5) nachgewiesen; die Detektion erfolgte mit Chlorsulfonsäure, die die Verbindung braun färbte.

Daten des chromatographischen Vergleichs der Verbindung c_{pub} mit authentischem Betulonaldehyd aus der Droge von Betula pendula:

System Chloroform, Kieselgel G: Beide Verbindungen zeigten einen Fleck vom Rf-Wert 0,92; die Detektion erfolgte mit Chlorsulfonsäure, die die Verbindungen braun färbte.

System Aluminiumoxyd G, Cyclohexan-Aceton (4 : 1): Beide Verbindungen zeigten einen Fleck vom Rf-Wert 0,90; Detektion s. System oben.

System Papier Nr. 2043 a "hy", Methanol-Aceton (49 : 1): Beide Verbindungen zeigten einen Fleck vom Rf-Wert 0,85; die Detektion erfolgte mit Antimon-V-chlorid, das die Verbindungen gelb färbte.

3.) Verbindung d

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion d wurde dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Er lieferte 470 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 212 - 215°. Der Schmelzpunkt wurde durch authentisches Lupeol (22) nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 212 - 215°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Saccharin liegt bei 196°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung d gelb: Nachweis der Äthylenbindung.

Elementaranalyse:

$C_{30}H_{50}O$	(426,7)	Ber.	C 84,44	H	11,81
		Gef.	C 84,40	H	11,82

Das IR-Spektrum der Verbindung d zeigt charakteristische Maxima bei 890, 1640, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C{=}CH_2$) und 1040, 3320 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe):

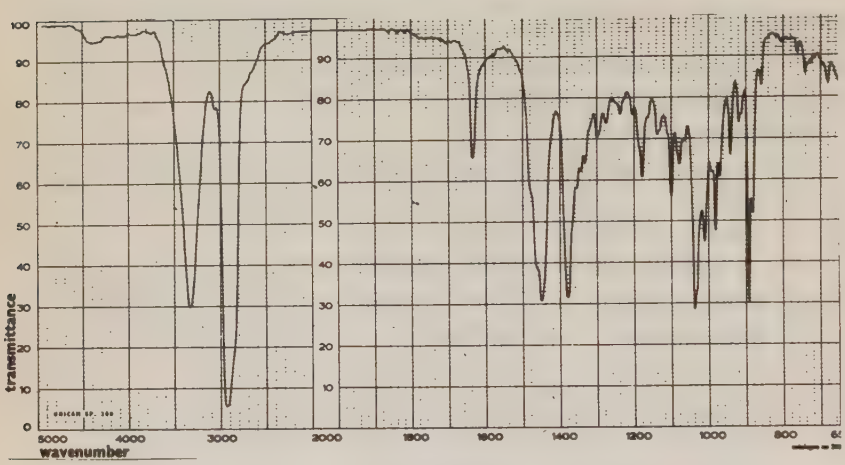


Abb. 19 IR-Spektrum der Verbindung d

Darstellung des Acetats

180 mg der Verbindung d wurden in 5 ml Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 44-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Reaktionsgemisch in 250 ml Eiswasser getropft. Der ausfallende weiße Niederschlag wurde abgesaugt und im Exsiccator getrocknet. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Athanol erhielt man 150 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 217 - 218° (Lupeolacetat (11): 218°).

Darstellung des 3,5-Dinitrobenzoats

Eine Lösung von 75 mg der Verbindung d und 75 mg 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in 20 ml Benzol wurde mit 1 ml Pyridin versetzt und 4 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die überschüssigen Reagenzien und eventuell gebildete Anhydride wurden durch viermaliges, abwechselndes Ausschütteln der Reaktionslösung mit 50

proz. Natronlauge und 12,5 proz. Salzsäure entfernt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand solange aus Benzol-Methanol umkristallisiert, bis die weißen Blättchen konstant bei 283 - 285° schmolzen.

Elementaranalyse:

$C_{37}H_{52}O_6N_2$	(620,8)	Ber.	C	71,58	H 8,44	N 4,51
		Gef.	C	72,02	H 8,51	N 4,28

4.) Verbindung d_{pub}

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion d_{pub} wurde dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Er lieferte 840 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 212 - 215°. Der Schmelzpunkt wurde durch authentisches Lupeol aus der Rinde von Betula pendula nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 212 - 215°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums d_{pub}/Saccharin liegt bei 196°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung d_{pub} gelb: Nachweis des Äthylengliedes. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Maxima bei 890, 1640, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C{=}CH_2$) und 1040, 3320 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe). Es ist identisch mit dem der Verbindung d (Lupeol), Abb. 19.

5.) Verbindung e_1

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion e_1 wurde dreimal aus Athanol-Wasser umkristallisiert. Er lieferte 60 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 190 - 192° (zug. Kapillare). Der Schmelzpunkt wurde durch authentischen Betulinaldehyd (38) nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 190 - 192° (zug. Kapillare). Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Salophen liegt bei 154°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung e_1 gelb: Nachweis des Äthylengliedes.

Elementaranalyse:

$C_{30}H_{48}O_2$	(440,7)	Ber.	C	81,76	H	10,98
		Gef.	C	81,15	H	11,00

Das IR-Spektrum der Verbindung e_1 zeigt charakteristische Maxima bei 885, 1640, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C=CH_2$), 1040, 3460 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe) und 1712, 2690 cm^{-1} (Aldehydgruppe):

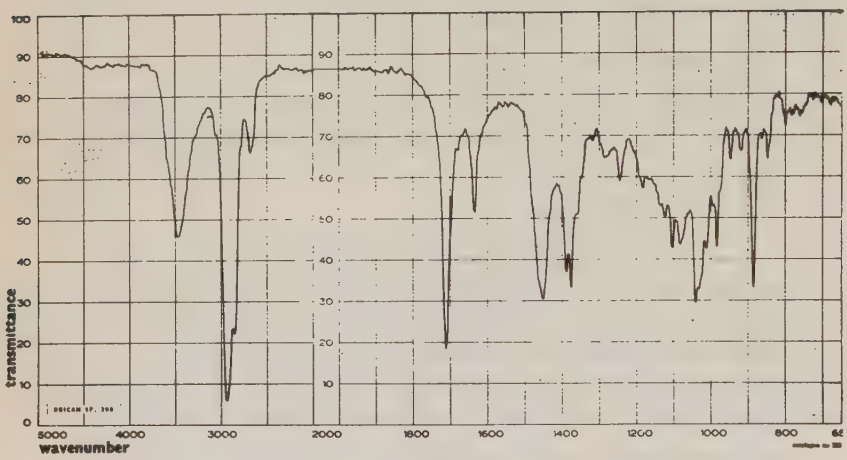


Abb. 20 IR-Spektrum der Verbindung e_1

Darstellung des Acetats und dessen Oxims

Die Verbindung e_1 wurde in der für das Lupeolacetat beschriebenen Weise (Pyridin-Essigsäureanhydrid) acetyliert. 100 mg des e_1-Acetats, Schmelzpunkt 175 - 180° (Literaturschmelzpunkt (1) des Acetyl-Betulinaldehyds: 173 - 180°), wurden anschließend mit 150 mg Hydroxylamin, 1 ml Pyridin und 10 ml abs. Alkohol 2 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. abgedampft, der Rückstand fein zerrieben und mit 5 ml Wasser versetzt. Nach dem Filtrieren wurde der Rückstand viermal aus Methanol umkristallisiert. Er lieferte 55 mg weiße Blättchen vom Schmelzpunkt 261 - 264°.

Elementaranalyse:

$C_{32}H_{51}O_3N$	(497,7)	Ber.	C 77,21	H 10,33	N	2,82
		Gef.	C 77,02	H 10,22	N	2,76

6.) Verbindung $e_{1\ pub}$

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion $e_{1\ pub}$ wurde dreimal aus Äthanol-Wasser umkristallisiert. Er lieferte 90 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 190 - 192° (zug. Kapillare), Der Schmelzpunkt wird durch authentischen Betulinaldehyd aus der Rinde von Betula pendula nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt liegt bei 190 - 192° (zug. Kapillare). Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Salophen liegt bei 154°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung $e_{1\ pub}$ gelb: Nachweis des Äthylengliedes. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Maxima bei 885, 1640, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C{=}CH_2$), 1040, 3460 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe) und 1712, 2690 cm^{-1} (Aldehydgruppe). Es ist identisch mit dem der Verbindung e_1 (Betulinaldehyd), Abb. 20.

7.) Verbindung e_2

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion e_2 wurde dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Er lieferte 55 mg weiße Blättchen vom Schmelzpunkt 138 - 139°. Der Schmelzpunkt wurde durch authentisches ß-Sitosterin[+)] nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 138 - 139°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Phenacetin liegt bei 119°. Die Substanz färbte sich auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan gelb: Nachweis des Äthylengliedes.

Elementaranalyse:

$C_{29}H_{50}O$	(414,7)	Ber.	C	83,99	H	12,15
		Gef.	C	84,59	H	12,24

Das IR-Spektrum der Verbindung e_2 zeigt charakteristische Maxima bei 800, 1630 cm^{-1} (trisubstituiertes Äthylenglied: $R_1R_2C{=}CHR_3$) und 1050, 3400 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe). Das Spektrum ist in der folgenden Abb. 21 dargestellt.

+) Handelsware der Fa. C. ROTH, Karlsruhe

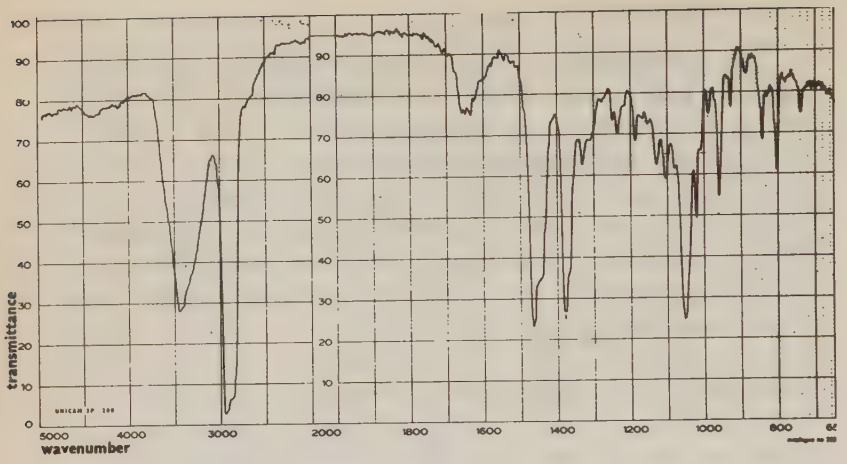


Abb. 21 IR-Spektrum der Verbindung e_2

Darstellung des 3,5-Dinitrobenzoats

Eine Lösung von 75 mg der Verbindung e_2 und 75 mg 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in 20 ml Benzol wurde mit 1 ml Pyridin versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die überschüssigen Reagenzien und eventuell gebildete Anhydride wurden durch viermaliges, abwechselndes Ausschütteln der Reaktionslösung mit 50 proz. Natronlauge und 12,5 proz. Salzsäure entfernt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand aus Benzol-Methanol umkristallisiert. Er lieferte 50 mg weiße Blättchen vom Schmelzpunkt 204 - 205°.

Elementaranalyse:

$C_{36}H_{52}O_6N_2$	(608,8)	Ber.	C 71,02	H 8,61	N 4,60
		Gef.	C 71,50	H 8,60	N 4,53

8.) Verbindung $e_{2\ pub}$

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion $e_{2\ pub}$ wurde dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Er lieferte 90 mg weiße Blättchen vom Schmelzpunkt 138 - 139°. Der

Schmelzpunkt wurde durch authentisches ß-Sitosterin aus der Rinde von Betula pendula nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 138 – 139°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Phenacetin lag bei 119°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung $e_{2\ pub}$ gelb: Nachweis der Äthylenbindung. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Maxima bei 800, 1630 cm^{-1} (trisubstituiertes Äthylenglied: $R_1R_2C{=}CHR_3$) und 1050, 3400 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe). Es ist identisch mit dem der Verbindung e_2 (ß-Sitosterin), Abb. 21.

9.) Verbindung B

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion B wurde dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Er lieferte 2,2 g weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 253 – 255°. Der Schmelzpunkt wurde durch authentisches Betulin (36) nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 253 – 255°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums Verbindung B/Saccharin lag bei 204°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung B gelb: Nachweis des Äthylengliedes.

Elementaranalyse:

$C_{30}H_{50}O_2$	(442,7)	Ber.	C	81,39	H	11,38
		Gef.	C	81,32	H	11,24

Das IR-Spektrum der Verbindung B zeigt charakteristische Maxima bei 885, 1642, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C{=}CH_2$), 1040, 3450 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe) und 1020, 3450 cm^{-1} (primäre Hydroxylgruppe).

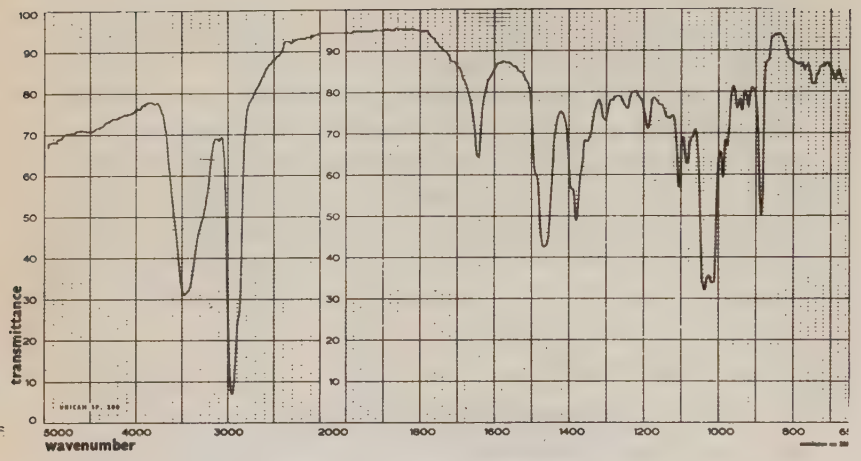


Abb. 22 IR-Spektrum der Verbindung B

10.) Verbindung B_{pub}

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion B_{pub} wurde dreimal aus Äthanol umkristallisiert. Er lieferte 1,55 g weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 253 - 255°. Der Schmelzpunkt wurde durch authentisches Betulin aus der Rinde von Betula pendula nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 253 - 255°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Saccharin lag bei 204°. Eine Probe der Verbindung B_{pub} färbte sich auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan gelb: Nachweis des Äthylengliedes. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Maxima bei 885, 1642, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C=CH_2$), 1040, 3450 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe) und 1020, 3450 cm^{-1} (primäre Hydroxylgruppe). Es ist identisch mit dem der Verbindung B (Betulin), Abb. 22.

11.) Verbindung f

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion f wurde dreimal aus Methanol umkristallisiert. Er lieferte 30 mg

weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 256 – 258°. Der Schmelzpunkt wurde durch authentische Acetyloleanolsäure[+)] nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 256 – 258°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums f-Methylester/Saccharin lag bei 200°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung f gelb: Nachweis des Äthylengliedes. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Maxima bei 1030, 1255, 1720 cm^{-1} (Acetylgruppe) und 1690, 2620 cm^{-1} (Carboxylgruppe):

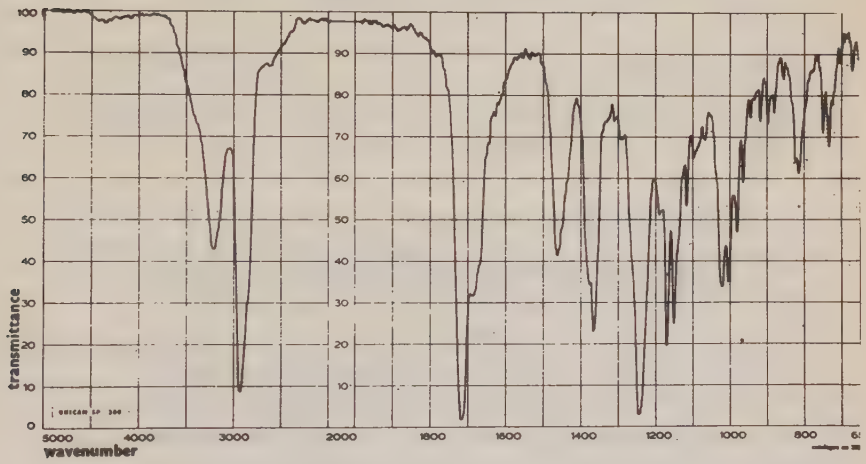


Abb. 23 IR-Spektrum der Verbindung f

Elementaranalyse:

$C_{32}H_{50}O_4$	(498,7)	Ber.	C	77,06	H	10,11
		Gef.	C	76,73	H	10,08

Darstellung des Methylesters:

0,5 g p-Tolylsulfonylmethylnitrosamid wurden in 20 ml Äther gelöst. Zu der eisgekühlten Lösung wurde eine Lösung von 0,1 g Kaliumhydroxyd in 5 ml 90 proz.

+) Nach (51) isolierte Oleanolsäure wurde acetyliert (Pyridin-Eisessig).

Äthanol getropft; ein sich bildender Niederschlag wurde durch einige zusätzliche Tropfen Äthanol wieder in Lösung gebracht. Nach 5 Min. wurde die ätherische Diazomethanlösung auf dem Wasserbad abdestilliert und zu einer Lösung von 60 mg der Verbindung f in 10 ml Äther gegeben. Nach beendeter Reaktion (Ende der Stickstoffentwicklung) wurden überschüssiges Diazomethan und die Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Der Trockenrückstand wurde solange aus Äthanol umkristallisiert, bis die weißen Blättchen konstant bei 217 - 220° schmolzen.

Elementaranalyse:

$C_{33}H_{52}O_4$	(512,8)	Ber.	C	77,29	H	10,22
		Gef.	C	76,76	H	10,23

12.) Verbindung f_{pub}

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion f_{pub} wurde dreimal aus Methanol umkristallisiert. Er lieferte 40 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 256 - 258°. Der Schmelzpunkt wurde durch authentische Acetyloleanolsäure aus der Rinde von Betula pendula nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 256 - 258°. Der Schmelzpunkt des Eutektikums f_{pub}-Methylester/Saccharin lag bei 200°. Eine Probe der Verbindung f_{pub} färbte sich auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan gelb: Nachweis des Äthylengliedes. Das IR-Spektrum der Verbindung zeigt charakteristische Maxima bei 1030, 1255, 1720 cm^{-1} (Acetylgruppe) und 1690, 2620 cm^{-1} (Carboxylgruppe); es ist identisch mit dem der Verbindung f (Acetyloleanolsäure), Abb. 23.

Darstellung des Methylesters

Die Darstellung dieses Derivats erfolgte in der für den f-Methylester beschriebenen Weise. Ich erhielt weiße Blättchen vom Schmelzpunkt 217 - 220°. Der Schmelzpunkt wurde durch f-Methylester (Acetyloleanolsäuremethylester) nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 217 - 220°.

13.) Verbindung g_2

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion g_2 wurde dreimal aus Methanol umkristallisiert. Er lieferte 80 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 308-311° (zug. Kapillare; ab 300° sintern). Der Schmelzpunkt wurde durch authentische Betulinsäure (37) nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 308-311° . Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Oleanolsäure lag bei 273°. Auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan färbte sich eine Probe der Verbindung g_2 gelb: Nachweis des Äthylengliedes.

Elementaranalyse:

$C_{30}H_{48}O_3$	(456,7)	Ber.	C	78,89	H	10,59
		Gef.	C	78,49	H	10,42

Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Maxima bei 885, 1635, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C=CH_2$), 1040, 3450 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe) und 1685 2620 cm^{-1} (Carboxylgruppe).

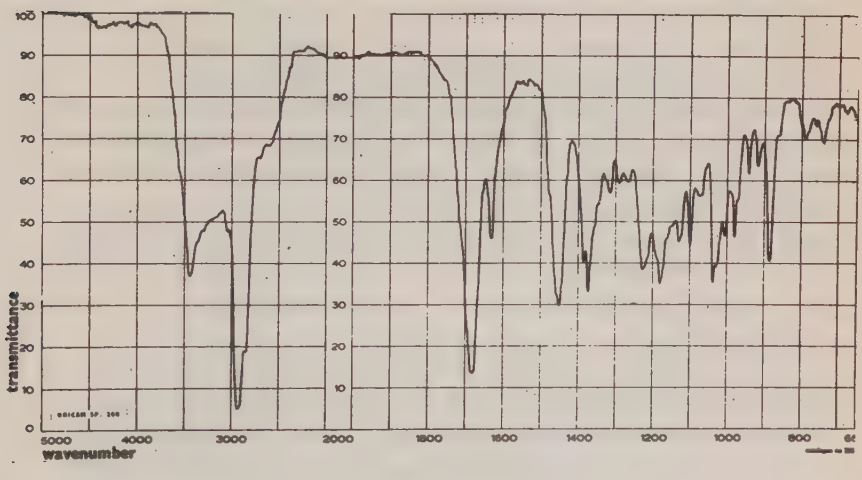


Abb. 24 IR-Spektrum der Verbindung g_2

Darstellung des Monoacetats

Das Monoacetat wurde in der für das Lupeolacetat beschriebenen Weise (Pyridin, Essigsäureanhydrid) dargestellt. Das Reaktionsprodukt wurde solange aus Methanol umkristallisiert, bis die weißen Nadeln konstant bei 284 - 286° schmolzen.

Elementaranalyse:

$C_{32}H_{50}O_4$	(498,7)	Ber.	C	77,06	H	10,11
		Gef.	C	76,95	H	10,01

14.) Verbindung $g_{2\ pub}$

Der Verdampfungsrückstand der Fraktion $g_{2\ pub}$ wurde dreimal aus Methanol umkristallisiert. Er lieferte 70 mg weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 308 - 311° (zug. Kapillare; ab 300° sintern). Der Schmelzpunkt wurde durch authentische Betulinsäure aus der Rinde von Betula pendula nicht erniedrigt; der Mischschmelzpunkt lag bei 308 - 311° (zug. Kapillare). Der Schmelzpunkt des Eutektikums mit Oleanolsäure lag bei 273°. Eine Probe der Verbindung $g_{2\ pub}$ färbte sich auf Zusatz eines Tropfens Tetranitromethan gelb: Nachweis des Äthylengliedes. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Maxima bei 885, 1635, 3079 cm^{-1} ($R_1R_2C{=}CH_2$), 1040, 3450 cm^{-1} (sekundäre Hydroxylgruppe) und 1685, 2620 cm^{-1} (Carboxylgruppe). Es ist identisch mit dem Spektrum der Verbindung g_2 (Betulinsäure), Abb. 24.

15.) Substanz H

Die Fraktion H lieferte nach dem Entfernen des Lösungsmittels eine geringe Menge Verdampfungsrückstand. Der darin enthaltene Triterpenanteil war mit braunen, harzigen Bestandteilen verunreinigt, die sich auch durch

wiederholtes Umkristallisieren nicht entfernen ließen; die Identifizierung erfolgte daher auf chromatographischem Wege. Die Daten des Vergleichs der Substanz H mit Oleanol- und Ursolsäure sind in Tabelle 9, Seite 54, zusammengefaßt. Der Triterpenanteil der Substanz H wurde als ein Gemisch von Oleanolsäure und Ursolsäure identifiziert.

16.) Substanz H_{pub}

Die Substanz H_{pub} wurde zur Identifizierung chromatographisch mit der Substanz H (Oleanol- -Ursolsäure-Gemisch) verglichen. Die beiden Substanzen verhielten sich dc und pc identisch. Die Daten des Vergleichs sind in Tabelle 11, Seite 63, zusammengefaßt.

D) Prüfung auf Allobetulin und zwei von HEJNO, JAROLÍM und ŠORM (17) nicht näher charakterisierte Acetyllactone

1.) Betula pendula

2 mg $E._{pen}$ wurden dc (Kieselgel G, Chloroform) nach der Keilstreifenmethode (44) chromatographiert. Zum Vergleich wurden 2 mg der gleichen Substanz, der 2 µg Allobetulin (dargestellt nach (8)) zugesetzt waren, aufgetragen. In dieser Vergleichsprobe konnte Allobetulin eindeutig nachgewiesen werden:

Rf-Lupeol=0,77 Rf-Betulinaldehyd=0,70
Rf-Allobetulin=0,65 Rf-ß-Sitosterin=0,60

Beim Extrakt $E._{pen}$ fehlte der Fleck des Allobetulins.

Im Bereich der Rf-Werte 0,77 (Lupeol) bis 0,65 (Allobetulin), in dem nach HEJNO, JAROLÍM und ŠORM die Flecken der beiden Lactone liegen müßten, konnten mit Chlorsulfonsäure keine entsprechenden Verbindungen nachgewiesen werden. Auch der Versuch der Isolierung

aus den Fraktionen d bis e_2 der Säulenchromatographie verlief negativ.

2.) Betula pubescens

2 mg E_{pub} wurden in der bei Betula pendula (siehe D,1) beschriebenen Weise auf Allobetulin und die zwei Acetyllactone geprüft. Es konnten nur die negativen Ergebnisse der Untersuchung der Rinde von Betula pendula reproduziert werden.

IX Literaturverzeichnis

1. Aplin, R.T., T.G. Halsal und T. Norin, J. Chem. Soc., p. 3269 (1963)
2. Asahina, Y. und M. Ishidate, Chem. Ber. 61, 533 (1928)
3. Bellamy, L.J., Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, übersetzt von W. Brügel, Darmstadt (1955)
4. Brieskorn, C.H. und L. Schlumprecht, Arch. Pharm. 238, 284 (1951)
5. Chapon, S. und S. David, Bull. Soc. chim. Franc., 333 (1953)
6. Cochrane, V.W., Physiology of Fungi, p. 156 New York (1958)
7. Dewar, S.J.M., The Elektronic Theorie of Organic Chemistry, p. 207, Oxford (1949)
8. Dischendorfer, O., Mh. Chem. 44, 123 (1923)
9. Domareva, T.V., V.F. Luponova, A.A. Ryabinin und J.A. Saltykova, Zhur. Obshchei Khim. 31, 2434 (1961); Chem. Abstr. 56, 1776 (1962)
10. Ehrhart, F., Beiträge zur Naturkunde und den damit verbundenen Wissenschaften, Bd. 5 und 6, Hannover-Osnabrück (1789 und 1791); G. Natho, Feddes Repertorium specierum novarum regni vegetabilis 61, 261 (1954)
11. Elsevier's Encyclopaedia of Organic Chemistry, Vol. 14 ed. by F. Radt, New York (1940)
12. Elsevier's Encyclopaedia of Organic Chemistry, Vol. 14 Supplement, ed. by F. Radt, Amsterdam-Houston-London-New York (1952)

13. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien, 12. Auflage II. Bd. von H. Melchior, Berlin (1964)

14. Eschenmoser, A., L. Ruzicka, O. Jeger und D. Arigoni Helv. chim. Acta 38, 1890 (1955)

15. Friedel, C., Bull. Soc. chim. Franc. 7, 164 (1892)

16. Hegi, G., Illustrierte Flora von Mitteleuropa, 1. Auflage, Bd. III, Seite 77, München

17. Hejno, K., V. Jarolím und F. Šorm, Coll. Czech. chem. Commun. 30, 1009 (1965)

18. Hirschmann, J. Am. Chem. Soc. 74, 5357 (1952)

19. Ingold, K.C., J. Chem. Soc. London, p. 2845 (1953)

20. Johnsson, H., Hereditas 31, 163 (1945)

21. Karrer, W., Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Basel und Stuttgart (1958)

22. Likiernik, B., Ber. dtsch. chem. Ges. 24, 183 (1891)

23. Lindquist, B., On the variation in Scandinavien Betula verrucosa Ehrh., with some notes on Betula series verrucosae Sukacz, in: Sv. Tidskr. 41, H. 1 (1947)

24. Linne, C., Species plantarum (1753); G. Natho, Feddes Repertorium specierum novarum regni vegetabilis 61, 261 (1954)

25. Lynen, F., B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning und E.M. Möslein, Angew. Chem. 71, 657 (1959)

26. Matyukhina, L.G., Zhur. Obshchei Khim. 34, 2796 (1964); Chem. Abstr. 61, 14724 (1964)

27. Natho, G., Feddes Repertorium specierum novarum regni vegetabilis 61, 211-273 (1954)

28. Nevell, P.T., E. de Salas und C.L. Wilson, J. Chem. Soc. London p. 1188 (1939)

29. Rilling, H., T.T. Tchen und K. Bloch, Proc. Natl. Acad. Sci. US 44, 167 (1958)

30. Rothmaler, W., Exkursionsflora von Deutschland, Kritischer Ergänzungsband-Gefäßpflanzen, von H. Melchior, Berlin (1963)

31. Row, L., C.S. Rao und T.S. Ramaiar, Curr. Sci. 33, 367 (1964)

32. Ruzicka, L., Helv. chim. Acta 1, 110 (1918)

33. Ruzicka, L., Eperienta 9, 357 (1953)

34. Ruzicka, L. in: Perspectives in Organic Chemistry, ed. by A. Todd, p. 265-314 New York (1956)

35. Ruzicka, F., G.F. Frame, H.M. Leicester, M. Liguori und H. Brüngger, Helv. chim. Acta 17, 426 (1934)

36. Ruzicka, L. und O. Isler, Helv. chim. Acta 19, 506 (1936)

37. Ruzicka, L. und A.H. Lamberton, Helv. chim. Acta 23, 1338 und 1341 (1940)

38. Ruzicka, L. und E. Rey, Helv. chim. Acta 24, 531 (1941)

39. Ryabinin, A.A. und V.F. Luponova, Zhur. Obshchei Khim. 31, 3478 (1961); Chem, Abstr. 57, 873 (1962)

40. Ryabinin, A.A. und L.G. Matyukhina, Zhur. Obshchei Khim 31, 1033 (1961); Chem. Abstr. 55, 22501 (1961)

41. Sandermann, W., in: Comparative Biochemistry, ed. by M. Florkin and H.S. Mason, Vol. III p. 591-630, New York und London (1962)

41a Shamma, M. und P.D. Rosenstock, J. org. Chem. 24, 726 (1959)

42. Simonsen, J.L. und W.C.J. Ross, The Terpenes, Bd. IV, p. 287 New York (1957)

43. Sosa, A., Ann. Chim. 5, 14 (1940)

44. Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)

45. Thoms, H., Chem. Zbl. 1102 (1898, II)

46. Tschesche, R., F. Lambert und G. Snatzke, J. of Chromatography 5, 217 (1961)

47. Vesterberg, K.A., Liebigs Ann. 428, 243 und 246 (1922)

48. Voser, W., M.V. Mijovic, H. Heusser, D. Jeger und L. Ruzicka, Helv. chim. Acta 35, 2414 (1952)

49. Wallach, O., Liebigs Ann. 239, 1 (1887)

50. Winstein, S., C.R. Lindgren, H. Marshall und L.L. Ingraham, J. Am. Chem. Soc. 75, 147 (1953)

51. Winterstein, A. und W. Hämmerle, Z. physiol. Chem. 56, 199 (1931)

52. Wright, L.D., E.L. Cresson, H.R. Skeggs, C.D.E. Mac Ray, C.H. Hoffmann, D.E. Wolf und K. Folkers, J. Am. Chem. Soc. 78, 5273 (1956)

53. Wolstenholme, G.E.W. und C.M. O'Connor, Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, London (1959)

54. Wrzeciono, U., Roczniki Chem. 37, (11) 1457-68; Chem. Abstr. 60, 8069 (1964)

55. Zellner, J. und L. Weiss, Monatsh. f. Chem. 46, 312 (1925)

Lebenslauf

Am 16. Juli 1938 wurde ich, Horst Kuhn, Sohn des Gärtners Karl Kuhn und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Soika, in Berlin geboren.

Im April 1944 wurde ich in die Volksschule Lindenhayn, Kreis Delitzch eingeschult, mein Abitur bestand ich 1958 an der Sophie-Scholl-Schule, Berlin-Schöneberg.

Meine Ausbildung als Apotheker begann im April 1958 in der Nonnendamm-Apotheke, Berlin-Siemensstadt. Nach zweijähriger Praktikantenzeit bestand ich das Vorexamen. Ab Mai 1960 studierte ich am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin Pharmazie und legte dort im April 1963 mein Staatsexamen ab.

Im Herbst des gleichen Jahres begann ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. Hänsel am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin mit meiner Doktorarbeit.

Meine Approbation als Apotheker erhielt ich im Mai 1965.

Ich bin verheiratet und habe ein Kind.